

Institut für Veterinärbakteriologie der Vetsuisse-Fakultät
Universität Zürich

Direktor: Prof. Dr. Max M. Wittenbrink

**Eisen-bindende Proteine bei *Mycoplasma suis*, einem nicht-
kultivierbaren haemotrophen Bakterium**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der
Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

vorgelegt von

NICOLE SCHWEIZER

Tierärztin
von Zumikon, ZH, Schweiz

genehmigt auf Antrag von

Prof. Dr. Ludwig E. Hoelzle, Referent
Prof. Dr. Regina Hofmann-Lehmann, Korreferentin

Zürich 2012

Inhaltsverzeichnis

1	Literaturübersicht	
1.1	Überblick über haemotrophe Mykoplasma	5
1.2	Eigenschaften von <i>Mycoplasma suis</i>	7
1.3	Das Krankheitsbild der infektiösen Anämie (syn. porcine Eperythrozoonose) ..	9
1.4	Pathogenese der <i>Mycoplasma suis</i> Infektion	11
1.5	Rolle des Eisens bei bakteriellen Infektionen	12
1.6	Eisenaufnahme von Bakterien	13
1.6.1	Siderophor-abhängige Eisen-Aufnahme	16
1.6.2	Direkte Eisenaufnahme aus Wirtsproteinen	17
1.6.3	Eisenbindende Proteine bei Mykoplasmen	17
1.6.4	Eisenbindende Proteine bei Erythrozyten-assoziierten Bakterien	18
1.7	Ziel der Arbeit	18
2	Material und Methoden	
2.1	<i>Mycoplasma suis</i> -Isolate	19
2.2	Aufreinigung von Antigenen aus Schweineblut	19
2.3	Expression und Aufreinigung des rekombinanten MSG1	20
2.4	Biotinylierung von Proteinen	21
2.5	Dot Blot zur Überprüfung der Biotinylierung	21
2.6	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	22
2.7	Ligandenblot	23
2.8	Koppelung von Proteinen an HiTrap NHS-aktivierte Säulen	24
2.9	Transferrin-Bindungs-ELISA	25
3	Ergebnisse	
3.1	Ligandenblot-Analysen zur Identifizierung von Transferrin-, Hämoglobin- und Häminbindenden Proteinen	26
3.2	Analysen zur Identifizierung von Transferrin-, Hämoglobin- und Häminbindenden Proteinen mittels NHS-Sepharose-gekoppelter Säulen	27
3.3	Analyse der Transferrin-bindenden Eigenschaften von <i>M. suis</i> MSG1	27
3.4	Abbildungen	29
4	Diskussion	36
5	Referenzen	40

Zusammenfassung

Mycoplasma suis ist ein hoch spezialisiertes, haemotrophes Bakterien, welches auf und in den Erythrozyten vieler Wirbeltiere parasitiert und beim Schwein die porcine infektiöse Anämie verursacht.

Da *M. suis* nicht kultivierbar ist, weiss man bis heute wenig über die Wirt-Pathogen-Interaktionen. Auch liegen keine Hinweise über die Eisenversorgung des Bakteriums vor. In dieser Arbeit wurden zwei methodische Ansätze verwendet um potentielle Eisen-bindende Proteine von *M. suis* zu identifizieren. Als potentielle *M. suis* Bindungspartner dienten Hämoglobin, Hämin und Transferrin (Tf). Bei der ersten Methode wurden die *M. suis*-Präparationen auf Nitrozellulose-Membranen immobilisiert und potentielle Bindungspartner mittels Bindung von Biotin-markiertem Transferrin, Hämoglobin bzw. Hämin gesucht. Die zweite Methode kehrte den Ansatz um: Zunächst wurden Transferrin, Hämoglobin bzw. Hämin an Sepharose immobilisiert und danach Bindungspartner durch die Bindung von *M. suis* gesucht. Anschliessend wurden potentielle *M. suis*-Bindungspartner mittels massenspektrometrischen Methoden identifiziert. Beide Methoden erlaubten es nicht, *M. suis*-Proteinen zu identifizieren. Weiter wurde geprüft, ob das GAPDH-homologe Adhäsionsprotein MSG1 von *M. suis* fähig ist, an Transferrin zu binden. Es konnte nachgewiesen werden, dass MSG1 an porcines Tf bindet und diese Tf-Bindung offensichtlich spezies-spezifisch ist.

Summary

Mycoplasma suis belongs to a group of highly specialized non-cultivable hemotrophic bacteria parasitizing on an in erythrocytes of many vertebrates. In swine *M. suis* causes the porcine infectious anemia .

Due to the uncultivability of *M. suis* little is known on the host-pathogen interactions. Furthermore, there are no indicators showing which iron-storing host proteins use the bacterium as an iron resource. The present study deals with two different methodical approaches in order to identify potential iron-binding proteins of *M. suis*. Hemoglobin, hemin and transferrin (Tf) could be potential *M. suis* binding partner during the process of iron acquisition. During approach one the *M. suis* preparations were immobilized on nitrocellulose membranes and potential binding partners were sought by means of binding Biotin marked Tf, hemoglobin, and hemin, respectively. During the second approach Tf, hemoglobin and hemin, respectively were immobilised on Sepharose and potential binding partners were sought by binding of *M. suis*. Potential *M. suis* binding partners were then identified by mass-spectrometric methods. Both approaches did not result in identifying *M. suis* proteins.

Furthermore, a potential role of the GAPDH homologous adhesion protein MSG1 of *M. suis* was investigated in respect of its ability to bind to Tf. In the case of *Trypanosoma brucei* and *Staphylococcus aureus* one knows, for example, that the GAPDH can attach to Tf. It was demonstrated that MSG1 binds to porcine Tf, and that Tf binding obviously is species-specific .

1 Literaturübersicht

1.1 Überblick über haemotrophe Mykoplasmen

Mycoplasma suis gehört zu einer Gruppe hoch spezialisierter, nicht kultivierbarer haemotropher Bakterien (haemotrophe Mykoplasmen, Haemoplasmen), die auf den Erythrozyten vieler Wirbeltiere parasitieren (Neimark et al., 2001; Hoelzle, 2007). Die Gruppe der Haemoplasmen umfasst Vertreter der ehemaligen Genera *Haemobartonella* und *Eperythrozoon* sowie neu entdeckte und definierte haemotrophe Mykoplasmen. Diese Reklassifizierung erfolgte nach der Analyse der 16S rDNA aufgrund der gegebenen phylogenetischen Verwandtschaft zum Genus *Mycoplasma* (Neimark et al., 2001) Daneben weist die Gruppe der haemotrophen Mykoplasmen eine Vielzahl von gemeinsamen phänotypischen Eigenschaften mit den weiteren Vertretern des Genus *Mycoplasma* auf, wie z.B. keine Zellwand, enger Kontakt mit der Wirtszelle, keine Flagellen, Resistenz gegen Penicillin, Empfänglichkeit gegen Tetracyclin (Messick, 2004; Hoelzle, 2007). Tabelle 1 gibt einen Überblick über alle bisher beschriebenen haemotrophen Mykoplasmen. Infektionen mit haemotrophen Mykoplasmen kommen bei zahlreichen Haus- und Wildtieren vor. Die bislang bekannten Erreger besitzen eine hohe Wirtsspezifität und können bei ihren Hauptwirten lebensbedrohende, akute hämolytische Anämien oder chronische Anämien und Immunsuppression verursachen. Aktuelle Untersuchungen belegen, dass haemotrophe Mykoplasmen auch bei Primaten und beim Menschen vorkommen (Messick, 2004; Dos Santos et al., 2008; Hu et al., 2009). Dabei handelt es sich entweder um offensichtlich zoonotische Infektionen mit z.B. *M. haemofelis* (Dos Santos et al., 2008), *M. suis* (Hu et al., 2009) oder *M. ovis* (Sykes et al., 2009) oder um einen möglicherweise humanspezifischen Vertreter der haemotrophen Mykoplasmen (i.e. *Cand. M. haemohominis*; Steer et al., 2012).

Obwohl haemotrophe Mykoplasmen seit über 80 Jahren als Krankheitserreger bekannt sind, ist es bisher nicht gelungen, ein *in vitro*-Kultursystem für diese ungewöhnlichen Bakterien zu etablieren (Messick, 2004; Hoelzle, 2008).

HAEMOTROPHE MYKOPLASMEN	WIRTSSPEZIES	REFERENZEN
<i>M. coccoides</i>	Maus Capybara	Neimark et al., 2005 Vieira et al., 2009
<i>M. haemomuris</i>	Maus, Ratte	Neimark et al., 2001
<i>M. haemofelis</i>	Katze	Neimark et al., 2001
<i>Cand. M. haemominutum</i>	Katze	Foley and Pedersen, 2001
<i>Cand. M. turicensis</i>	Katze	Willi et al., 2005
<i>M. suis</i>	Schwein, Wildschwein	Neimark et al., 2001
<i>M. ovis</i>	Schaf, Ziege, Hirsch, Reh	Neimark et al., 2004
<i>M. wenyonii</i>	Rind	Neimark et al., 2001
<i>Cand. M. haemobos/haemobovis</i>	Rind	Tagawa et al., 2008
<i>M. haemocanis</i>	Hund	Neimark et al., 2002
<i>Cand. M. haematoparvum</i>	Hund	Sykes et al., 2005
<i>Cand. M. haemodidelphis</i>	Opossum	Neimark et al., 2002
<i>Cand. M. haemolamae</i>	Lama	Neimark et al., 2002
<i>Cand. M. kahanei</i>	Totenkopffäffchen	Neimark et al., 2002
<i>Cand. M. equi</i>	Pferd	Dieckmann et al., 2010
<i>Cand. M. aoti</i>	Nachtaffe	Barker et al., 2011
<i>Cand. M. haemocervae</i>	Sikawild	Watanabe et al., 2010
<i>Cand. M. haemozalophi</i>	Seelöwe	Volokhov et al., 2011
<i>Cand. M. haemovis</i>	Schaf	Hornok et al., 2009
<i>Cand. M. haemohominis</i>	Mensch	Steer et al., 2012

Tabelle 1: Überblick über alle bisher beschriebenen haemotropen Mykoplasmen.

Cand. = *Candidatus*

1.2 Eigenschaften von *Mycoplasma suis*

Die Morphologie von *M. suis* ist vielgestaltig. Eine einzelne Zellmembran umschliesst die Bakterienzelle und im Cytoplasma sind kleine Granula und Filamente zu finden. In der Fachliteratur sind verschiedene Erscheinungsformen der Zelle beschrieben: sie kann rund bis lang gestreckt sein und einen Durchmesser von 0,3 bis 3 µm aufweisen. Je nach Vermehrungsstadium unterscheidet man bei *M. suis* jugendliche kokkoid bis diskusförmige Formen und ringförmige reife Organismen (Zachary and Basgall, 1985). Während der akuten Krankheitsphase von Schweinen wurden die Erscheinungsformen auf den Erythrozyten nebeneinander beobachtet. Anscheinend ist für die Vermehrung von *M. suis* der enge Kontakt mit der Erythrozytenmembran essentiell (Hoelzle, 2007). Bei chronisch infizierten Schweinen traten kreisrunde bis elliptische, abgerundete Ruheformen auf (Liebich and Heinritzi, 1992). Im gefärbten Blutausstrich von infizierten Schweinen beobachtet man lichtmikroskopisch, dass *M. suis* vereinzelt, in Ketten oder als Ringe angeordnet ist. Im Plasma gibt es auch freie Formen. Abbildung 1 zeigt das mikroskopische Bild eines Ausstrichs nach experimenteller Infektion mit *M. suis* nach Anfärbung mit Acridin-Orange.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen ergaben, dass *M. suis* in Vertiefungen und Eindellungen der Erythrozytenmembran zu finden ist. Ein ca. 10-30 nm grosser Spalt trennt die anhaftenden Bakterien von der Zelloberfläche. *M. suis* bindet sich durch feine mikrofibrilläre Strukturen an die Erythrozyten (Zachary & Basgall, 1985; Messick, 2004; Hoelzle, 2007). Abbildung 2 zeigt elektronenmikroskopisch *M. suis* im engen Kontakt mit seiner Wirtszelle, dem Schweine-Erythrozyten. Untersuchungen unserer Forschungsgruppe haben gezeigt, dass *M. suis* fähig ist, in Erythrozyten einzudringen (Groebel et al., 2009; Abbildung 3).

M. suis besitzt ein zirkuläres, doppelsträngiges Genom mit einer Grösse von ca. 709 bis 741 kbp und einem GC-Gehalt von 31% (Oehlerking et al., 2011; Messick et al., 2011; Guimaraes et al., 2011). Damit kommt *M. suis* nahe an die theoretische Minimalgrösse eines Organismus heran, der noch in der Lage ist, sich zu replizieren (Hoelzle, 2007). *M. suis* gehört, wie alle bisher sequenzierten haemotrophen Mykoplasmen zu denjenigen Mykoplasmenvertretern, die Energie in Form von ATP ausschließlich über die Glykolyse produzieren (Oehlerking et al., 2011; Guimaraes et al., 2011; Barker et al., 2011; Santos et al., 2011). Viele Stoffwechselwege und Transportsysteme sowie große Teile des Nukleotidsynthese-Apparates fehlen im Genom von *M. suis*. Ein besonderes Kennzeichen

des *M. suis*-Genoms liegt in dem sehr großen Anteil an hypothetischen, nicht annotierbaren Proteinen, die ca. 65% des gesamten Genoms darstellen (Oehlerking et al., 2011). Alle diese Faktoren sprechen für eine starke Adaptation des Bakteriums an eine bestimmte Umgebung/Zielzelle, von der essenzielle Substanzen bezogen werden.

M. suis gilt, wie alle anderen haemotrophen Mykoplasmen, als wirtsspezifisch und wurde bisher nur im Schwein nachgewiesen. Auch konnten haemotrophe Mykoplasmen des Lamas (*Candidatus M. haemolamae*) nicht auf das Schwein oder andere Tierarten übertragen werden (McLaughlin et al., 1991). Daher erfolgt die Vermehrung des Erregers für die experimentellen Arbeiten im Labor nach wie vor im splenektomierten Schweinmodell.

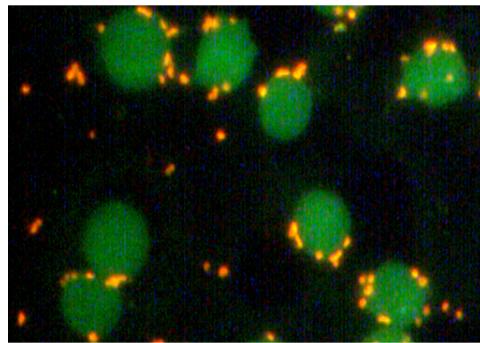


Abbildung 1: Blutausstrich eines mit *M. suis* experimentell infizierten Schweines nach Färbung mit Acridin-Orange (aus Hoelzle, 2008)

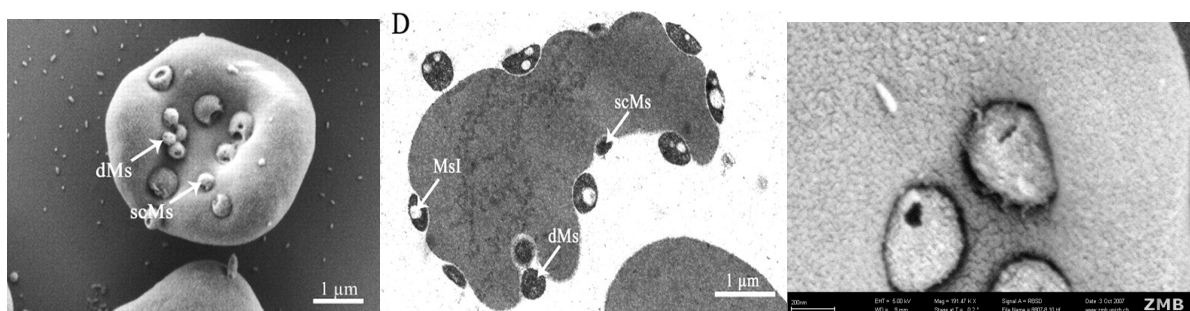


Abbildung 2: Elektronenmikroskopische Aufnahmen (Raster- und Transmissionselektronenmikroskopie) von Erythrozyten eines mit *M. suis* experimentell infizierten Schweines (aus Groebel et al., 2009).

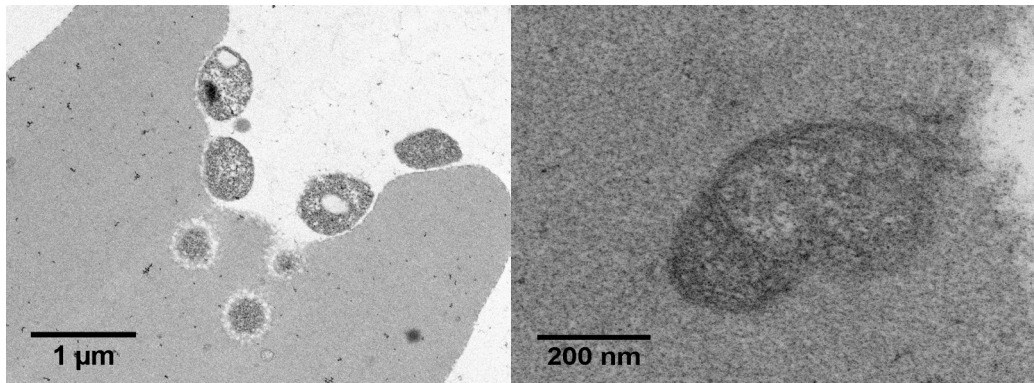


Abbildung 3: Darstellung der Invasion von *M. suis* in Schweineerythrozyten (aus Groebel et al., 2009)

1.3 Das Krankheitsbild der infektiösen Anämie (syn. porcine Eperythrozoonose)

Erkrankungen, die durch *M. suis* ausgelöst werden, sind weltweit verbreitet und von grosser wirtschaftlicher Bedeutung für die Schweinehalter. *M. suis* wurde bisher in Europa (Deutschland, Schweiz, Belgien; Ritzmann et al., 2009), Nordamerika (Messick, 2004), Südamerika (Guimaraes et al., 2008) und Asien (Zhou et al., 2009; Yuan et al., 2009; Wu et al., 2006) nachgewiesen. Wegen der schwierigen Diagnose sind umfangreiche Prävalenz-Daten nur aus Deutschland verfügbar. Dort ergab eine Untersuchung an 1176 Mastschweinen aus 196 Betrieben eine Einzeltierprävalenz von 13,9 % und eine Bestandesprävalenz von 40,3 % (Ritzmann et al., 2009). In den USA wurden Seren von ca. 15000 Schweinen mittels Hämagglutinationstest auf *M. suis* getestet. Dabei waren ca. 15% der Tiere serologisch positiv (Messick 2004). Eine aktuelle Studie weist nach, dass *M. suis* neben Hausschweinen auch in Wildschweinen vorkommt, insbesondere in Fällen, wo Wildschweine in Gehegen gehalten werden (Hoelzle et al., 2010). Das stützt die Annahme, das Wildschwein diene als Reservoir für *M. suis*.

Die Übertragung von *M. suis* erfolgt entweder durch direkten Kontakt (Rangkämpfe und kleine Verletzungen) oder durch Vektoren. Ferner kann *M. suis* durch orale Infektion übertragen werden, da der Erreger im Urin ausgeschieden wird (eigene Untersuchungen). Ausserdem wird eine vertikale Übertragung diskutiert (Henderson et al., 1997). Der hauptsächliche Verbreitungsweg ist vermutlich der iatrogene Modus z. B. durch kontaminiertes Injektionsbesteck oder Oberkieferschlingen (Henry, 1979). Unter experimentellen Bedingungen konnte nachgewiesen werden, dass *M. suis* durch

blutsaugende und blutleckende Arthropoden wie z.B. die Schweinelaus, Mosquitos oder Stallfliegen von Schwein zu Schwein übertragen werden kann (Prullage et al., 1993).

Das klinische Erscheinungsbild der porcinen infektiösen Anämie reicht von subklinischer bis lebensbedrohlicher Symptomatik. In der akuten Form der *M. suis*-Infektion treten eine ausgeprägte Bakteriämie mit den Hauptsymptomen Fieber, Anämie, Ikterus und Zyanosen an den Ohrrändern sowie eine ausgeprägte Hypoglykämie auf (Heinritzi et al., 1984; Hoelzle, 2007; Abbildung 4). Diese Form findet man hauptsächlich bei Absetzferkeln und Mastschweinen. Pathogenetisch sehr bedeutend sind erregerinduzierte Immunreaktionen gegen wirtseigene Strukturen (Felder et al., 2010). *M. suis* ist wahrscheinlich in der Lage, Strukturen auf der Erythrozytenoberfläche zu modifizieren und dadurch die Bildung von autoreaktiven Antikörpern der Klasse IgM (sogenannte Kälteagglutinine) zu induzieren (Zachary & Smith 1985). Gleichzeitig werden warm-autoreaktive Antikörper der Klasse IgG durch *M. suis* induziert, die gegen das Aktin auf der Erythrozytenoberfläche gerichtet sind. Vermutlich sind bei diesem autoreaktiven Prozess Vorgänge des „molecular mimicry“ beteiligt (Felder et al., 2010). Die Bindung der warm- und kaltreaktiven Auto-Antikörper an Erythrozytenstrukturen führt letztendlich zu einer immunvermittelten hämolytischen Anämie.

Die chronische Form der *M. suis*-Infektion herrscht heutzutage in der modernen Schweinehaltung vor. Die Schweine zeigen meist nur milde Symptome wie geringgradige Anämie, milder Ikterus, Wachstumsdepression, Reproduktionsstörungen. Diese Leistungsdepression gepaart mit einer erhöhten Anfälligkeit für andere Infektionskrankheiten des Respirations- und Verdauungstrakts haben nennenswerte wirtschaftliche Einbussen in der Schweinehaltung zur Folge (Schweighardt et al., 1986; Zinn et al., 1983; Brownback, 1981; Henry, 1979; Hoelzle, 2007). Anscheinend ist *M. suis*, ähnlich wie andere Mykoplasmen, in der Lage, das Immunsystem des Wirts zu modulieren und zu supprimieren (Zachary & Basgall, 1985; Hoelzle, 2007).

Der Erreger wird in der Regel nicht vollständig eliminiert, obwohl die Immunantwort während der Infektion (Hoelzle et al., 2006; Hoelzle et al., 2009) oder nach einer Behandlung mit Tetracyclin (Hoelzle, 2007) stark ist. Ein möglicher Grund ist die Fähigkeit von *M. suis* zur Invasion und Persistenz in Erythrozyten (Groebel et al., 2009). *M. suis* kann also in asymptomatischen Trägartieren lange Zeit persistieren. Unter bestimmten Bedingungen (z.B. Stress, Umstallung, andere Infektionskrankheiten) kann aber eine akute

Erkrankung mit massiver Bakteriämie jederzeit wieder auftreten. Asymptomatische Trägartiere sind daher von besonderer epidemiologischer Bedeutung (Hoelzle, 2007).

1.4 Pathogenese der *Mycoplasma suis*-Infektion

Da es nicht möglich ist, haemotrophe Mykoplasmen im Labor zu vermehren, sind viele Fragen über die Erregerbiologie und Pathogenese der durch *M. suis* induzierten Erkrankungen offen.

Offensichtlich spielt die enge Interaktion von *M. suis* mit den Erythrozyten eine wichtige Rolle in der Pathogenese. Man weiss, dass Erreger und Wirtszelle über Mikrofibrillen interagieren (Zachary & Basgall, 1985; Hoelzle, 2007). Über die Komposition des bakteriellen Adhäsionskomplexes weiss man bislang sehr wenig. Bisher wurden zwei Adhäsionsproteine beschrieben. Es handelt sich zum einen um das Protein MSG1, das auf der Oberfläche von *M. suis* exprimiert wird (Hoelzle et al., 2007). MSG1 ist ein Protein, das der Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) analog und glykolytisch aktiv ist. Bei dem zweiten Adhäsionsprotein handelt es sich um die alpha-Enolase, ebenfalls ein Enzym der Glykolyse-Kaskade (Schreiner et al., 2012). Auch von anderen Bakterien wie z.B. Streptokokken ist bekannt, dass sogenannte „house keeping“ Proteine (z. B. essentielle Stoffwechsel-Enzyme) als Virulenzfaktoren fungieren können (Pancholi et al., 2003).

Autoimmunologische Prozesse scheinen wichtig zu sein, damit die Anämie entsteht. Die akute Phase der Krankheit geht sowohl mit der transienten Bildung von Kälteagglutininen (IgM-Antikörper; Zachary & Smith, 1985; Hoelzle, 2007) als auch von autoreaktiven IgG-Antikörpern (Hoelzle et al., 2006; Felder et al., 2010) einher. Kälteagglutinine sind meist gegen ein Carbohydrat-Antigen auf der Erythrozyten-Membran (I-Antigen) gerichtet. Kälteagglutinine findet man analog auch bei der durch *M. pneumoniae* verursachten respiratorischen Erkrankung des Menschen und den *M. gallisepticum* und *M. synoviae*-Infektionen des Geflügels (Hoelzle, 2007). Für *M. suis* ist der genaue Bindungspartner noch nicht identifiziert.

Als weiterer möglicher Mechanismus der Entstehung der Anämie wurde der Prozess der Eryptose beschrieben (Felder et al., 2011). Definiert wird „Eryptose“ als suizidaler Zelltod (Apoptose) von Erythrozyten, der insbesondere durch Zellschrumpfung, Oberflächenexposition von Phosphatidylserin und Aktivierung eines Ca^{2+} durchlässigen

Kationenkanal gekennzeichnet ist. Eryptotische Vorgänge, v.a. die Phosphatidylserin-Exposition führen es zu einer stark vermehrten Makrophagenaktivität und damit zur Entstehung von einer Anämie (Lang et al., 2006; Felder et al., 2011).

In der akuten Phase der Erkrankung treten beim Schwein ausserdem massive metabolische Störungen auf. Die Konzentrationen von Lactat und Pyruvat, sowie der pCO₂ sind stark erhöht, die Bicarbonat-Konzentration ist herabgesetzt, und die Basenabweichung ist negativ (Heinritzi et al. 1990 a, b). Die Azidose des Bluts besteht aus einer metabolischen und respiratorischen Komponente (Heinritzi, 1989; Heinritzi et al., 1990 b). Ausserdem kommt es zu einer lebensbedrohenden Hypoglykämie, die nachweislich mit dem Stoffwechsel von *M. suis* assoziiert ist (Heinritzi et al., 1990 a, b; Smith et al., 1990; Nonaka et al., 1996).

1.5 Rolle des Eisens bei bakteriellen Infektionen

Eisen ist eines der wichtigsten Spurenelemente für das Wachstum von Bakterien im Wirtsorganismus. Eine Ausnahme bilden die Laktobacillen, die Mangan und Kobalt anstelle von Eisen als Biokatalysator nutzen, sowie *Borrelia burgdorferi* (Weinberg, 1997; Guerinot, 1994; Posey & Gherardini, 2000). Im Gegensatz zu fast allen anderen benötigten Nährstoffen und Spurenelementen ist Eisen nicht in ausreichender Menge frei verfügbar. Unter aeroben Bedingungen liegt Eisen fast ausschliesslich in oxidiertem Fe(III)-Form vor. Fe(III) hat aber mit 10⁻¹⁸ M eine sehr geringe Löslichkeit (Martinez et al., 1990). Daher spielt die Akquisition von Eisen im Wirt eine Schlüsselrolle für bakterielles Wachstum im Wirt. Kenntnisse über die Eisen-Akquisitionsmechanismen liefern daher wichtige Ansatzpunkte, um neue Chemotherapeutika oder prophylaktische Massnahmen wie z.B. Impfstoffen zu entwickeln. Im Wirt ist Eisen notwendig für wichtige Zellfunktionen wie z.B. den Transport und die Lagerung von Sauerstoff, als Katalysator in Elektronentransportprozessen, als Co-Faktor für Enzyme in der DNA Synthese (Litwin & Calderwood 1993; Earhart, 1996). Ein Überschuss an freiem Eisen ist aber auch toxisch. Freie Eisenionen sind in der Lage, die sogenannte Fenton-Reaktion zu katalysieren, wobei Superoxid und Hydrogenperoxid zu freien, reaktiven Radikalen reagieren. Dadurch kommt es zu erhöhtem oxidativen Stress und vorzeitiger Zellalterung (Emery, 1991). Daher ist eine exakte Regulierung des Eisenstoffwechsels enorm wichtig, um die Eisen-Homöostase, i.e. Absorption, Verlust und der Gebrauch zu gewährleisten. Im Wirt ist Eisen fest an hoch-affine Eisentransportproteine wie Transferrin,

Laktoferrin, Ferritin gebunden oder funktionell an Hämoglobin, Myoglobin und Cytochrom C. Die Konzentration des frei verfügbaren Eisens liegt bei ca. 10^{-12} μM und damit deutlich unter der Konzentration, die essentiell für bakterielles Wachstum ist (i.e. 0.05 – 0.5 μM ; Martinez et al., 1990; Griffith, 1991). Bei Transferrin und Laktoferrin handelt es sich um Glykoproteine, die in der Leber synthetisiert werden. Beide Moleküle besitzen zwei hoch-affine Fe(III)-Bindungsstellen. Transferrin bindet freies Fe(III) im Serum und transportiert es zu allen Zellen und Geweben, wo dieser Transferrin-Eisen Komplex anschließend an spezifische Rezeptoren bindet und in die Zellen aufgenommen wird (Guerinot, 1994). Die Höhe des Serum-Transferrins korreliert mit der Größe des Eisenpools. In der Regel ist Transferrin nie vollständig mit Eisen abgesättigt, d.h. es sind immer freie Kapazitäten da, um freies Eisen aufzunehmen. Dadurch wird sichergestellt, dass kein freies Fe vorhanden ist. Dieser „Eisenspeicher-Puffer“ stellt einen wichtigen Mechanismus in der Abwehr von bakteriellen Infektionen dar. Wichtigstes Eisenspeichermolekül ist das Ferritin, das aus identischen Untereinheiten, dem Apoferritin, aufgebaut ist. Ferritin kann pro Molekül mehr als 4000 Eisen-Ionen binden in Form eines inorganischen Makrokomplexes.

Laktoferrin findet man in der Milch, im Speichel, in der Tränenflüssigkeit und auf den Schleimhäuten des Respirations-, Gastrointestinal- und Harntrakts, also dort, wo sich der primäre Herd für bakterielle Infektionen befindet (Guerinot, 1994).

1.6 Eisenaufnahme von Bakterien

Die Fähigkeit, Eisen aus Ferritin, Transferrin, Hämoglobin oder anderen Eisen-bindenden Proteinen zu gewinnen, ist für das Überleben und die Vermehrung von Bakterien im Wirtsorganismus essentiell. Eisen ist in Bakterien aufgrund seines weiten Redoxpotentials an einer Vielzahl von Elektronentransport-Vorgängen beteiligt (z.B. Bestandteil wichtiger Enzyme der Atmungskette und des Intermediärstoffwechsels; Litwin & Calderwood, 1993; Earhart, 1996). Im aeroben Milieu konkurrieren Bakterien mit dem Wirtsorganismus um freies Eisen. Dafür haben sie eine Vielzahl von Systemen entwickelt, die es ihnen ermöglicht, Eisen aus wirtseigenen Eisen-bindenden Systemen zu akquirieren. Diese Systeme sind häufig eng assoziiert mit der Virulenz von Bakterien (Martinez et al., 1990).

Grundsätzlich unterscheidet man drei Mechanismen:

1. Die Reduktion von Fe(III) zu Fe(II) führt zu einer Mobilisation von Eisen. Freier werdendes Eisen kann dann als Fe(II) von Bakterien aufgenommen werden. Bakterien wie z. B. Streptokokken oder Legionellen können auf diese Weise Eisen akquirieren (Guernot, 1994)
2. Bakterien produzieren Siderophore, die als spezielle Eisenchelatoren Eisen mit hoher Affinität binden. Siderophore wiederum binden spezifisch an die Bakterienzelle, und es kommt zur Aufnahme von Eisen in die Bakterien. Diesen Mechanismus findet man bei einer Vielzahl von Bakterien und Pilzen (Guerinot, 1994).
3. Bakterien verbinden sich direkt mit Eisen-speichernden oder -bindenden Wirtsproteinen. Dieser Kontakt mobilisiert unmittelbar Eisen z.B. aus Transferrin, Laktoferrin und Hämin. Dieser Mechanismus wird z.B. von *Haemophilus influenzae*, *Helicobacter pylori*, Neisserien und Yersinien verwendet (Guerinot, 1994).

Tabelle 2 gibt eine Übersicht über die in der Literatur beschriebenen bakteriellen Eisen-Akquirierungssysteme. In Bakterien kann freies intrazelluläres Eisen toxisch sein, da überschüssige Eisen-Ionen in Form der Fenton-Reaktion zur Bildung von freien reaktiven Radikalen aus Superoxid und Hydrogenperoxid führen. (Guerinot, 1994). Daher ist die Aufnahme von Eisen in die Bakterienzelle reguliert und es existieren in vielen Bakterien Eisenspeicher-Proteine wie z.B. das Bakterioferritin, die das freie Eisen in einer für das Bakterium nicht-toxischen Form „verwalten“ (Massover, 1993; Harrison & Lilley, 1989)

BAKTERIEN	EISEN-BESCHAFFUNG	REFERENZEN
MYKOPLASMEN		
<i>M. pneumoniae</i>	Laktoferrin (reversibel)	Tryon and Baseman 1987
<i>M. capricolum</i>	Eisen in Zellmembran gespeichert	Bauminger et al., 1980
HAEMOTROPHE BAKTERIEN		
<i>Bartonella quintana</i>	Hämin-bindende Proteine (8, membranassoziiert)	Carroll et al., 2000
<i>Bartonella birtlesii</i>	Häm Transportsystem	Nijssen et al., 2009
<i>Bartonella henselae</i>	Hämin, Hämoglobin	Sander et al., 2000
GRAM-POSITIVE BAKTERIEN		
<i>Bacillus subtilis</i>	Siderophore (Bacillibactin) Xenosiderophore (Petrobactin, <i>B. cereus</i>)	May et al., 2001; Ollinger 2006; Schneider et al.,1993
<i>Staphylococcus aureus</i>	Siderophore (Staphyloferrin A / B), Häm Eisen Aufnahmesystem	Konetschny-Rapp et al., 1990; Haag et al., 1994; E.P Skaar et al.,2004
GRAM-NEGATIVE BAKTERIEN		
Fluoreszierende <i>Pseudomonas</i>	3 Häm Aufnahmesysteme, Siderophore (Pyoverdine und sekundäre Siderophore) Xenosiderophore	Ochsner et al., 2000; Schalk et al., 2002; Greenwald et al., 2007; Imperi et al. ,2009; Bodilis et al.,2009
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Siderophore (Acinetobactin), Hämin	Dorsey et al.,2004; Yamamoto et al.,1994
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	Transferrin, Hämoglobin, Hämin	Deneer et al. ,1989; Gonzalez et al.,1992
Pathogene <i>Neisseria</i>	Xenosiderophore, Transferrin, Häm, Hämoglobin	West and Sparling, 1985; Gray-Owen and Schryvers,1996; Dyer et al., 1987

Tabelle 2: Übersicht über bakterielle Eisenakquirierungssysteme

1.6.1 Siderophor-abhängige Eisen-Aufnahme

Siderophore (griech.: sideros = Eisen, phorein = tragen) werden von Bakterien gebildet. Sie sind kleine Moleküle mit einer Grösse von 400-1000 Da, die mit hoher Affinität Fe(III) binden (Braun et al., 1998; Earhart, 1996). Siderophore werden bei Fe-Mangel gebildet und an die Umgebung abgegeben. Sie sind in der Lage Fe(III) aus unlöslichen Komplexen oder aus Fe-bindenden Wirtsproteinen wie Transferrin und Laktoferrin zu entfernen und zu binden. Die Bindung erfolgt als Chelat-Komplexe. Danach binden die Siderophore-Eisen-Komplexe an spezifische Rezeptoren auf der Bakterien-Oberfläche und die Zelle nimmt diese energieabhängig über hochspezialisierte Transportsysteme auf. Im Zytoplasma wird Eisen freigesetzt und verwertet. Die Expression von Siderophoren sowie der korrespondierende Rezeptoren wird über die Eisen-Verfügbarkeit reguliert (Guerinot, 1994). Aufgrund der funktionellen Gruppen innerhalb der Siderophor-Moleküle unterscheidet man zwei chemischen Klassen (Guerinot, 1994; Litwin & Calderwood, 1993; Earhart, 1996): die Catecholate (z.B. Enterobactin und Salmochelin) und die Hydroxamate (z.B. Aerobactin, Ferrichrom und Ferrioxamin). Das Catecholat Enterobactin findet man bei einer Vielzahl von Mitgliedern der Familie *Enterobacteriaceae*. Das Hydroxamat Aerobactin ist mit der Invasivität von *Escherichia coli* und *Shigella flexneri* assoziiert (Mietzner and Morse, 1994). Bei gramnegativen Bakterien weiss man, dass bei Eisenmangel komplexe Rezeptor- und Transportsysteme für diese Siderophore zum Zug kommen. Daran binden entweder selbst produzierte Siderophore oder Siderophore, die von anderen Bakterienarten synthetisiert wurden. Nach der Bindung an Rezeptoren ändert sich in der Regel die Konformation der Siderophore, um die Internalisation der Liganden zu ermöglichen. Der Eisen-Transport durch die äussere Membran ist energieabhängig (Guerinot, 1994), der Transport durch die Cytoplasma-Membran erfolgt über ABC-Transporter (Stintzi et al., 2000). Der genaue Mechanismus, der im Cytoplasma das Eisen aus den importierten Fe(III)-Siderophor-Komplexen freisetzt, ist nicht aufgeklärt. Eine mögliche Erklärung ist die enzymatische Reduktion von Fe(III) zu Fe(II), das dann wegen der niedrigeren Affinität aus dem Komplex freigesetzt wird. (Guerinot, 1994). So besitzt zum Beispiel *E. coli* eine Ferri-Siderophor-Reduktase, die die Reduktionsreaktion katalysiert.

1.6.2 Direkte Eisenaufnahme aus Wirtspoteinen

Verschiedene Bakterien können Hämin und Hämoglobin sowie Transferrin und Laktoferrin als Eisenquelle nutzen (Guerinot, 1994). Dieser Mechanismus der Eisen-Gewinnung ist häufig mit einer hohen Wirtsspezifität verbunden (Weinberg, 2009). Bakterien, die auf diese Weise Eisen aus Hämin aufnehmen sind z.B. die pathogenen Bakterien *Yersinia pestis*, *Y. enterocolitica* und *Vibrio cholerae* (Perry, 1993; Stoebner and Payne, 1988). Andere Bakterien wie z.B. Neisserien, *Haemophilus influenzae* können Transferrin oder Laktoferrin direkt als Eisenquelle nützen (Otto et al., 1992). Um aus Eisen-bindenden Wirtspoteinen Eisen aufzunehmen ist ein direkter Kontakt zur Bakterienzelle notwendig. Meistens binden z.B. Transferrin oder Laktoferrin an einen Rezeptor auf den Bakterien. Für Neisserien wurden zum Beispiel zwei Transferrin-bindende Proteine, das Tbp1 und das Tbp2, und zwei Laktoferrin-bindende Proteine, das Lbp1 und Lpb2, identifiziert, die sich in der äusseren Membran der Bakterien befinden (Guernot, 1994). In der Regel sind diese Transferrin- und Laktoferrin-Rezeptoren streng spezifisch für die jeweiligen Eisentransportproteine des jeweiligen natürlichen Wirts (Schryvers & Gonzales, 1990; Gerlach et al., 1992).

1.6.3 Eisenbindende Proteine bei Mykoplasmen

Über Eisen bindende Proteine bei Mykoplasmen weiss man bislang sehr wenig. Die Arbeitsgruppe von Tyron und Baseman (1987) konnten nachweisen, dass *M. pneumoniae* spezifisch an Laktoferrin bindet, *M. genitalium* dagegen nicht. Beide Bakterienspezies banden sich nicht an Transferrin. Diese Bindung von *M. pneumoniae* an Laktoferrin ist deshalb so interessant, da Laktoferrin von sekretorischen Zellen muköser Oberflächen z.B. im Respirationstrakt (i. e. dem Habitat von *M. pneumoniae*) sezerniert wird (Aisen & Listowski, 1980; Bezkorovainy, 1981). Welche Rolle die Fähigkeit, Eisen aus Laktoferrin zu mobilisieren, für die Virulenz von *M. pneumoniae* spielt, ist unklar. Auch apathogene Mutanten von *M. pneumoniae* sind in der Lage, Laktoferrin *in vitro* zu binden (Tyron & Baseman, 1987).

1.6.4 Eisenbindende Proteine bei Erythrozyten-assoziierten Bakterien

Neben den haemotrophen Mykoplasmen parasitieren auch Bartonellen Erythrozyten. Sie sind fähig, in Erythrozyten einzudringen und sich darin zu vermehren (Seubert et al., 2002). Für ein Wachstum *in vitro* benötigen Bartonellen entweder Blut, Erythrozyten oder Hämin Zusätze (Carroll et al., 2000). Tatsächlich besitzt *Bartonella quintana*, der Erreger des Trench Fiebers, den größten, bisher bekannten *in vitro* Hämin-Bedarf für ein Bakterium. (Carroll et al., 2000). Für *B. quintana* konnten Hämin-bindende Proteine identifiziert werden, die mit hoher Affinität Hämin binden und zum Teil auf der Oberfläche der äusseren Membran lokalisiert sind (Carroll et al., 2000). Ausserdem konnte am Beispiel von *B. quintana* genetisch ein vollständiges Hämin-Aufnahmesystem nachgewiesen werden. Es besteht aus einem Häminrezeptor, einem Hämin-ABC-Transportsystem sowie einem Hämin-Speicherenzym (Parrow et al., 2009). Die Eigenschaft von Bartonellen, Eisenquellen zu verwerten, spiegelt also offensichtlich in besonderer Weise die biologische Nische bzw. den Lebenszyklus dieser Bakterien wider.

1.7 Ziel der Arbeit

Die Verfügbarkeit von Eisen spielt für das Überleben und die Vermehrung von Bakterien im Wirtsorganismus eine Schlüsselrolle. Daneben sind Eisenstoffwechsel-Systeme von Bakterien häufig mit der Virulenz assoziiert. Für *M. suis* und alle anderen haemotrophen Mykoplasmen ist bislang nicht bekannt, ob und welche Eisen-Akquirierungsmechanismen vorhanden sind und benützt werden. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich daher mit der Identifizierung von potentiellen Transferrin-, Hämoglobin- und Hämin-bindenden Proteinen.

2 Material und Methoden

2.1 *Mycoplasma suis*-Isolate

Die *M. suis*-Isolate stammen aus dem Betrieb der Klinik für Schweine an der Universität München. Dort wurde Schweinen aus Betrieben, in denen wegen des klinischen Bildes der Verdacht auf Eperythrozoonose bestand, Blut entnommen. Quantitative LightCycler PCR (Hoelzle et al., 2007) ermöglichten den Nachweis der *M. suis*-Infektionen. Die Forscher in München übertrugen das Blut von *M. suis*-positiven Tieren auf splenektomierte Schweine. Sie kontrollierten den klinischen Status der Tiere täglich, der *M. suis*-Status wöchentlich, indem sie einen Akridin-Orange gefärbten Blutaussstrich mikroskopisch beurteilten und einen quantitativen LightCycler PCR durchführten.

2.2 Aufreinigung von Antigenen aus Schweineblut

Material:

- Alsever-Lösung (Sigma, Buchs, Schweiz)
- PBS-Lösung (Sigma, Buchs, Schweiz)
- Bradford Protein Quantifizierungskit (BioRad, Reinach, Schweiz)

Als die klinischen Symptome am stärksten ausgeprägt waren und die mit Akridinorange gefärbten Blutaussstriche eine hohe *M. suis*-Dichte aufwiesen, wurde den Tieren abhängig vom Gewicht bis zu 200 ml Blut entnommen. Das Blut wurde in 50 ml Polypropylen-Röhrchen im Verhältnis 1:1 mit Alsever-Lösung vermischt und somit ungerinnbar gemacht. Anschliessend wurde das Blut 20 min bei 500 x g (Labofuge 400, Heraeus) zentrifugiert und das Plasma entnommen. Dann wurde das Plasma 2 h bei 20000 x g, bei 4 °C zentrifugiert (Sorvall RC 6 Plus, Rotor SS34, Heraeus). Das Pellet wurde zweimal mit PBS gewaschen (Resuspension und Zentrifugation) und anschliessend in 1 ml PBS resuspendiert. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C. Unter gleichen Bedingungen wurde Blut von *M. suis*-negativen Schweinen aufgereinigt und als Kontrolle für die weiteren Versuche verwendet. Die Konzentration der Antigene wurde mittels Bradford Protein-Quantifizierungskit nach Angaben des Herstellers ermittelt.

2.3 Expression und Aufreinigung des rekombinanten MSG1

Material:

- M9 Salzlösung: 85.2 mM NaCl, 422 mM Na₂HPO₄, 220 mM KH₂PO₄, 187 mM NH₄Cl, pH 7.4
- RM-Medium: 20 g Casaminoacids (Becton Dickinson), 10 ml Glycerol 99%, ad 880 ml mit A. bidest auffüllen, autoklavieren, dann sterile Zugabe von 1 ml 1 M MgSO₄, 10 ml 20%ige Glucose, 100 ml M9Salzlösung, 1 ml Ampicillin (100 mg/ml)
- Arabinose, 20 %ig (Sigma, Buchs, Schweiz)
- PBS-Lösung (Sigma, Buchs, Schweiz)
- Resuspendierpuffer : PBS, 20 mM Imidazol
- Elutionspuffer: PBS, 400.0 mM Imidazol
- Chelating Sepharose Fast Flow (Amersham Biosciences, Otelfingen, Schweiz)
- Nickelsulfat-Lösung, NiSO₄, 0.2 M
- Bradford Protein Quantifizierungskit (BioRad, Reinach, Schweiz)

Mit 2 ml einer frischen Übernachtskultur von *E. coli*_pBad_MSG1 wurden 200 ml RM-Medium beimpft und bei 37°C bis zu einer optische Dichte OD₆₀₀ von 0.6 inkubiert. Die Proteinexpression wurde durch die Zugabe von Arabinose (Endkonzentration von 0.02 %) induziert und die Kulturen weitere 3 h geschüttelt. Anschliessend wurden die Bakterien 10 min mit 6500 x g bei 4°C zentrifugiert (Sorvall RC 6 Plus, Rotor Heraeus HFA 12.500).

Um die Proteine durch Metall-Affinitätschromatographie aufzureinigen, wurde Chelating Sepharose Fast Flow verwendet, die mit Ni²⁺-Ionen gekoppelt waren. Ni²⁺-Ionen binden mit hoher Affinität an die mit dem rekombinanten Protein exprimierten sechs Histidin-Reste (6xHis). Die Elution erfolgt mit Imidazol, da Imidazol aufgrund seiner homologen Struktur 6xHis kompetitiv aus der Bindung verdrängt. Chelating Sepharose (1 ml) wurde nach den Weisungen des Herstellers unter Verwendung von NiSO₄-Lösung mit Ni²⁺ gekoppelt.

Für die Aufreinigung wurde das Bakterienpellet mit 20 ml Resuspendierpuffer resuspendiert und anschliessend auf Eis beschallt (Ultrasonic Processor; Vibra cell, Merck). Die Suspension wurde dann zentrifugiert (30 min, 4°C, 26.000xg; Sorvall RC 6 Plus, Rotor SS34, Heraeus). Der Überstand wurde mit der Ni²⁺-gekoppelt Sepharose vermischt und 1 h auf Eis unter Schütteln inkubiert. Danach wurden die Proben bei Raumtemperatur 3 min mit 500xg zentrifugiert, die Sepharose drei Mal mit 20 ml Resuspendierpuffer gewaschen und die Proteine in 3x1 ml Fraktionen mit Elutionspuffer eluiert. Als Kontrolle wurden rekombinante *E. coli*_pBadMycHis (ohne Insert) in gleicher Weise mitgeführt. Die Konzentration der rekombinanten Proteine wurde mit einem Bradford Protein-Quantifizierungskit nach

Angaben des Herstellers ermittelt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proteine bei -80°C gelagert.

2.4 Biotinylierung von Proteinen

Material:

- Biotin Labeling Kit (Roche, Rotkreuz, Schweiz)
- PBS (Sigma, Buchs, Schweiz)
- Proteine: Porcines Transferrin (First Link, (UK) Ltd)
Humanes Transferrin (Sigma, Buchs, Schweiz)
Porcines Hämoglobin (Sigma, Buchs, Schweiz)
Porcines Hämin (Sigma, Buchs, Schweiz)

Vor jeder Markierungsreaktion wurde die Biotin-7-NHS-Lösung mit DMSO entsprechend den Angaben des Herstellers frisch angesetzt. 1 mg des Proteins (i.e. rekombinantes MSG1, porcines, humanes und Kaninchen-Transferrin) wurden in 2 ml PBS gelöst. Dann wurde 5.7 µl Biotin (= 0.114 mg Biotin) dazugeben und die Lösung 2 h bei Raumtemperatur unter leichtem Rühren in einem-Erlenmeyerkolben inkubiert. Um überschüssiges Biotin zu entfernen wurde anschliessend eine Säulenaufreinigung (Gelfiltration, Sephadex G-25) durchgeführt. Zunächst wurden unspezifische Bindungsstellen der Säulenmatrix durch die Zugabe von 5 ml Blockingpuffer geblockt und die Säule anschliessend sechs Mal mit PBS gewaschen. Der Reaktionsansatz der Biotinylierung wurde auf die Säule aufgetragen. Die Elution des Proteins erfolgte mittels PBS in 10 Fraktionen mit jeweils 0.5 ml.

2.5 Dot Blot zur Überprüfung der Biotinylierung

Material:

- Protran Nitrocellulose-Transfermembran, Porengrösse 0,45 µm (Schleicher & Schuell, Riehen, Schweiz)
- TBS: 10 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 8.5
- TBS-Tween: TBS mit 0,05% Tween 20
- Blocking-Puffer: TBS + 2% Magermilchpulver (Sigma, Buchs, Schweiz)
- Streptavidin-POD-konjugiert (Sigma, Buchs, Schweiz)
- Entwickler-Lösung A: 60 mg 4-Chloro-1-naphthol (Sigma, Buchs, Schweiz), 20 ml Methanol, eiskalt
- Entwickler-Lösung B: 100 ml TBS, eiskalt, 60 µl H₂O₂ (Sigma, Buchs, Schweiz)

Um die Biotinylierungsreaktion zu überprüfen wurde jeweils 1 µl jeder Proteinfraction nach Elution von der Sephadex G-25-Säule auf eine Nitrocellulose-Membran getropft. Die

Membran wurde luftgetrocknet und anschliessend für 1h bei Raumtemperatur in Blockingpuffer auf einem Laborschüttler geschwenkt. Danach wurde zwei Mal für 10 min mit TBS gewaschen. Dann wurde die Membran für 2h bei Raumtemperatur mit Streptavidin-POD (1:500 in Blockingpuffer) inkubiert, danach je zwei Mal für 10 min mit TBS-Tween und TBS gewaschen und die Farbreaktion im Entwickler (Entwickler A und B, kurz vor Gebrauch gemischt) innerhalb von 20 bis 30 min sichtbar gemacht.

2.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Material:

- Mini-Protean 3 Elektrophorese-System (Biorad, Reinach, Schweiz)
- Acrylamid-/Bisacrylamid-Lösung 30 %, 37,5:1 (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Trenngel-Puffer: 1,88 M Tris, pH 8.8
- Sammelgel-Puffer: 0.50 M Tris, pH 6.8
- Probenpuffer (5x): 18.4 ml A. bidest., 4.0 ml Sammelgel-Puffer, 3.2 ml Glycerol, 3.2 ml SDS, 10%, 1.6 ml Bromphenolblau, 1% 500 µl β-Mercaptoethanol
- Laufpuffer: 0.03 M Tris, 0.23 M Glycin, 0.08% SDS
- Prestained Protein Marker (BioLabs, Allschwil, Schweiz)
- TEMED (BioRad, Reinach, Schweiz)
- Ammoniumpersulfat 10%
- Trenngel: 1.7 ml Acrylamid/Bisacrylamidlösung, 1.0 ml Trenngel-Puffer, 1.0 ml SDS, 0,5%, 1.3 ml A. bidest., 10 µl Temed, 40 µl Ammoniumpersulfat
- Sammelgel: 0.33 ml Acrylamid/Bisacrylamidlösung, 0.40 ml Sammelgel-Puffer, 0.40 ml SDS, 0,5%, 0.87 ml A. bidest., 10 µl Temed, 10 µl Ammoniumpersulfat

Die Trenngel-Lösung wurde gemischt, mit einer Glaspipette bis zu einer Höhe von 5 cm zwischen zwei Glasplatten gefüllt und mit 96% Ethanol überschichtet. Die Polymerisation des Gels war nach 1 h abgeschlossen.

Das Ethanol wurde vom Trenngel abgegossen, das Sammelgel eingefüllt und der Kamm zur Bildung der Probentaschen eingesetzt. Die Polymerisationszeit des Sammelgels betrug 30 min. Die Proteinproben wurden mit Probenpuffer (5x) vermischt und 10 min gekocht. Für die Elektrophorese wurde das Lämmli-Puffersystem (Lämmli, 1970) verwendet. Pro Geltasche wurden 1 µg Protein bzw. Kontrollpräparation aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 200 V für ca. 35 min. In jedem Lauf wurde der Molekulargewichtsstandard mitgeführt.

Die Visualisierung der Proteinbanden erfolgte durch eine Färbung mit Coomassie. Das Gel wurde zunächst fixiert und anschliessend über Nacht bei RT in Färbelösung auf dem Laborschüttler (Platform Shaker STR6, Stuart Scientific) inkubiert. Danach wurde das Gel in Aqua bidest. entfärbt.

Um eine höhere Sensitivität zu erreichen, wurden Gele mittels Silver Stain Kit (BioRad, Reinach, Schweiz) nach Angaben des Herstellers gefärbt.

Ausgewählte Banden wurden aus colloidal Coomassie-gefärbten Gelen ausgeschnitten und anschliessend einer Peptidmassen-Fingerprintanalyse (MALDI-TOF-MS) bei der Firma Toplab, Martinsried, Deutschland unterzogen.

2.7 Ligandenblot

Material:

- Transferkammer: Mini Trans-Blot Cell-System (Biorad, Reinach, Schweiz)
- Protran Nitrocellulose-Transfermembran, Porengrösse 0,45 µm (Schleicher & Schuell, Riehen, Schweiz)
- Gel-Blotting-Filterpapier (Schleicher & Schuell, Riehen, Schweiz)
- Transfer-Puffer: 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% Methanol
- TBS: 10 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 8.5
- TBS-Tween: TBS mit 0,05% Tween 20
- Blocking-Puffer: TBS + 2% Fötales Kälberserum (Biochrom, Berlin, Deutschland)
- Streptavidin-POD-konjugiert (Sigma, Buchs, Schweiz)
- Entwickler-Lösung A: 60 mg 4-Chloro-1-naphthol (Sigma, Buchs, Schweiz), 20 ml Methanol, eiskalt
- Entwickler-Lösung B: 100 ml TBS, eiskalt, 60 µl H₂O₂ (Sigma, Buchs, Schweiz)

Die in der SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden im Semidry-Verfahren auf die Nitrozellulosemembran übertragen. Dazu wurde das Gel zunächst kurz im Transferpuffer äquilibriert, und mit Whatman-Filterpapier und Nitrozellulosemembran (angefeuchtet mit Transferpuffer) in das Semidry-Blottinggerät (TransBlot, BioRad) entsprechend den Angaben des Herstellers eingelegt. Der Transfer erfolgte bei 10 Volt, 30 min.

Anschliessend wurden die Membranen 1 h in Blockingpuffer bei Raumtemperatur inkubiert und dann zweimal 10 min in TBS gewaschen. Die Membranen wurden über Nacht mit den biotinylierten Proteinen (1:500 in Blockingpuffer verdünnt) auf dem Schüttler (Platform

Shaker STR6, Stuart Scientific) inkubiert. Nach Waschen in TBS (3 Mal, 10 min bei Raumtemperatur) wurden die Membranen in verdünntem POD-konjugierten Streptavidin (1:250 in Blockingpuffer) 2 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Anschliessend wurden die Membranen je zweimal für 10 min bei Raumtemperatur in TBS-Tween und TBS gewaschen. Die Entwicklung erfolgte in dem Gemisch aus den Entwickler-Lösungen A und B für 20-30 min. Danach wurden die Membranen mehrmals in A. bidest. gewaschen und zwischen zwei Filterpapieren getrocknet. Die Auswertung der Grösse der detektierten Bande erfolgte mit Hilfe des BioProfil-Bildanalysesystems (Fröbel, Wasserburg, D).

2.8 Koppelung von Proteinen an HiTrap NHS-aktivierte Säulen

Material:

- HiTrap NHS-aktivierte Säulen (GE Health Care, Amersham, England)
- Porcines Transferrin (First Link, Birmingham, England)
- Porcines Hämoglobin (Sigma, Buchs, Schweiz)
- Porcines Hämin (Sigma, Buchs, Schweiz)

Porcines Transferrin, Hämoglobin und Hämin wurden entsprechend den Angaben des Herstellers an die NHS-gekoppelten Säulen gebunden. Anschliessend wurde M. suis-Präparationen und negative Blutpräparationen auf die Säule aufgetragen und gewaschen. Die Elution erfolgte durch Puffer mit pH-Werten im sauren Bereich (Elutionspuffer mit pH-Werten von 6.5, 6.0, 5.0, 4.0, 3.0, und 2.0). Die Elutionsfraktionen wurden einzeln in 1.5 ml Reaktionsgefässen aufgefangen und im SDS-PAGE mit anschliessender Coomassie- und Silberfärbung analysiert. Wenn keine Proteinbanden in den Gelen sichtbar waren, wurden die Protein-Fraktionen mit 1:3 mit eiskaltem Aceton (100%) über Nacht bei 4°C gefällt. Anschliessend wurde bei 20000xg 90 min zentrifugiert. Die Pellets wurden getrocknet und in PBS gelöst und so im SDS-Polyacrylamidgel analysiert.

2.9 Transferrin-Bindungs-ELISA

Material:

- 96-Loch-Mikrotiterplatten (Microlon, Greiner, Nürtingen, Deutschland)
- Coating-Puffer: 5.0 mM Na₂CO₃, 34.8 mM NaHCO₃, 3.0 mM NaN₃, pH 9.6
- Blockingpuffer :PBS pH 7.4 (Sigma, Buchs, Schweiz), 1% Proteose-Pepton (Brunschwig, Basel, Schweiz)
- Verdünnungspuffer: PBS pH 7.4 (Sigma, Buchs, Schweiz), 0.5% Proteose-Pepton, 0.05% Tween 20
- Waschpuffer: PBS pH 7.4, 0.05% Tween 20
- Streptavidin-POD-konjugiert (Sigma, Buchs, Schweiz)
- Substrat: 0.73 mM ABTS (2,2-Azino-di [3-ethyl-Benzthiazolinsulfat]; Roche), 100 mM Zitrat-Phosphat-Puffer, pH 4.2, 2 mM H₂O₂

Porcines und humanes Transferrin wurden in Coating-Puffer auf eine Konzentration von 50 µg/ml eingestellt. In die Mikrotiterplatten wurden 100 µl Verdünnungspuffer vorgelegt. Die erste Reihe (Löcher A bis H) bis wurde mit 100 µl Transferrin pro Vertiefung beschickt, anschliessend im log₂ titriert und 1 h bei Raumtemperatur auf einem Plattenschüttler geschüttelt sowie über Nacht bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Platten mit einem automatischen Waschgerät (Tecan, Männedorf, CH) gewaschen. Alle weiteren Inkubationsschritte wurden bei Raumtemperatur 1 h auf einem Plattenschüttler durchgeführt und zwischen den Inkubationsschritten wurden die Platten gewaschen. Zur Verhinderung von unspezifischen Reaktionen wurde mit 200 µl Blockingpuffer inkubiert. Das biotinylierte rekombinante MSG1 wurde in einer Konzentration von 50 µg/ml in die erste Reihe (Löcher 2 bis 12) und im log₂ titriert. Das Streptavidin-Konjugate (1:2000 verdünnt in Verdünnungspuffer) wurde mit 100 µl/Vertiefung eingesetzt. Nach 1 h Inkubation wurden nach dem Waschen 100 µl Substrat zugegeben und 30 min inkubiert. Ein computergesteuerter Mikroplattenleser (Tecan, Männedorf, CH) lieferte die OD-Werte bei 405 nm.

3 Ergebnisse

3.1 Ligandenblot-Analysen zur Identifizierung von Transferrin-, Hämoglobin- und Hämin-bindenden Proteinen.

Um putative Transferrin-, Hämoglobin- und Hämin-bindende Proteine von *M. suis* zu identifizieren wurde die Methode des Ligandenblots verwendet. Dabei wurden Antigen-Präparationen von *M. suis*-Isolaten nach elektrophoretischer Auftrennung im SDS-Polyacrylamidgel und Transfer auf Nitrozellulose-Membranen mit biotinyliertem porcinem Transferrin, Hämoglobin und Hämin inkubiert. Die Biotinylierung der Proteine wurde im Dot Blot-Verfahren überprüft (Abbildung 5).

Im anschliessenden Ligandenblot reagierte das porcine Transferrin in der *M. suis*-Antigenpräparation mit einer 54.5 kDa-Bande und einer 39.0 kDa-Bande (Abbildung 6a). In der negativen Kontrollpräparation reagierte das porcine Transferrin mit einer 39.0 kDa-Bande (Abbildung 6a). Porcines Hämoglobin reagierte in der *M. suis*-Antigenpräparation mit einer 25.5 kDa-Bande, in der negativen Kontrollpräparation war keine Bindung sichtbar (Abbildung 6b). Porcines Hämin reagierte in der *M. suis*-Antigenpräparation mit zwei Banden mit der Grösse von 37.0 und 32.0 kDa (Abbildung 6c). Mit der negativen Kontrollpräparation war keine Reaktion vorhanden. Die Banden bei 39.0 kDa (Transferrin-Blot), 37.0 kDa (Hämin-Blot) und 25.5 kDa (Hämoglobin-Blot) waren im korrespondierenden, Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamidgel eindeutig ansprechbar und wurden daher für weitere massenspektrometrischen Analysen (i.e. Peptidmassen-Fingerprintanalysen) ausgewählt. Die Proteinbanden wurden nach Reduktion der Cystin und Carbamidomethylierung der Sulfhydrylgruppen im Gel mit der Endopeptidase Trypsin verdaut und die erhaltenen Peptide mit Maldi-TOF-MS vermessen. Die Datenbanksuche mit den Peptidmassen gegen die NCBI Datenbank (www.ncbi.nlm.nih.gov/) führte für die 39.0 kDa-Bande zu einer Identifizierung des Proteins als porcines Fibrinogen gamma. Die 37.0 kDa-Bande konnte als porcines Fibrinogen beta, die 25.5 kDa Bande als porcines Fibrinogen A alpha Chain identifiziert werden.

3.2 Analysen zur Identifizierung von Transferrin-, Hämoglobin- und Hämin-bindenden Proteinen mittels NHS-Sepharose-gekoppelter Säulen

Im nächsten Schritt wurden Transferrin- Hämoglobin- und Hämin-gekoppelte Sepharose-Säulen verwendet, um putative Transferrin-, Hämoglobin- und Hämin-bindende Proteine von *M. suis* zu identifizieren. *M. suis*-Präparationen wurden auf diese Säulen aufgetragen, nicht gebundene Proteine gewaschen und anschliessend die gebundenen Proteine mittels Elutionspuffer mit erniedrigtem pH-Wert ($\text{pH} < 6.0$) eluiert. Analoge Versuche wurden mit negativen Kontrollpräparationen durchgeführt. Nach der Analyse im SDS-Polyacrylamidgel konnten von den mit Transferrin gekoppelten Sepharosesäulen aus der *M. suis*-Präparation Banden mit der Grösse von 72.2 und 57.0 kDa eluiert werden, die in den Kontrollversuchen nicht sichtbar waren (Abbildung 7a). In den Versuchen mit Hämoglobin-gekoppelten Säulen wurden aus der *M. suis*-Präparation eine Proteinbande mit 41.0 kDa identifiziert, die in der Kontrolle nicht vorhanden war (Abbildung 7b). Von den Hämin-gekoppelten Säulen wurden aus der *M. suis*-Präparation Banden mit der Grösse von 59.5 und 54.5 kDa eluiert. In den Versuchen mit den negativen Kontrollpräparationen waren keine Banden sichtbar (Abbildung 7c). Mittels anschliessender Peptidmassen-Fingerprintanalyse konnte die 54.5 kDa Bande eindeutig als porcines Immunglobulin G (schwere Kette), die 59.5 kDa-Bande als Fibrinogen und die 41.0 kDa-Bande porcines Aktin identifiziert werden.

3.3 Analyse der Transferrin-bindenden Eigenschaften von *M. suis* MSG1

MSG1 ist ein oberflächenständiges Adhäsionsprotein von *M. suis*, das Eigenschaften und Funktion einer Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) aufweist (Hoelzle et al., 2007). Für andere Bakterien, insbesondere für Staphylokokken, ist bekannt, dass oberflächenständiges GAPDH die Fähigkeit besitzt, an humanes Transferrin zu binden (Modun & Williams, 1999; Modun et al., 2000). Um zu untersuchen, ob *M. suis* MSG1 porcines Transferrin bindet, wurde das MSG1 zunächst rekombinant in *Escherichia coli* hergestellt und anschliessend biotinyliert. Die Biotinylierung wurde im Dot Blot-Verfahren überprüft. In Ligandenblot- und ELISA Untersuchungen wurde geprüft, ob sich MSG1 an porcines Transferrin binden kann. Abbildung 8 zeigt, dass im Ligandenblot *M. suis* MSG1 deutlich mit porcinem Transferrin reagiert. Mit humanem Transferrin war die Reaktion

signifikant schwächer. Keine Reaktionen konnten mit Kaninchen Hämin und Hämoglobin nachgewiesen werden.

Die ELISA-Versuche ergaben, dass *M. suis* MSG1 konzentrationsabhängig mit porcinem Transferrin reagiert. Die Bindung von *M. suis* MSG1 war zudem abhängig von der Transferrin-Konzentration. Zwischen der Bindung von *M. suis* MSG1 an porcines Transferrin und humanes Transferrin konnte ein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden (Abbildung 9).

3.4 Abbildungen

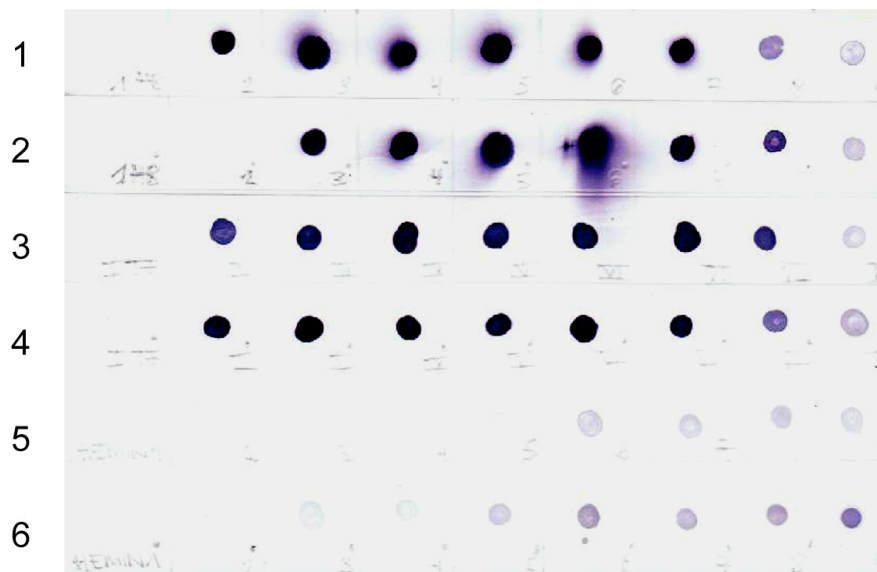


Abbildung 5: Dot Blot zur Überprüfung der Biotinylierung. Reihe 1 und 2 zeigen die Farbreaktionen des biotinylierten Transferrin mit Streptavidin, Reihe 2 und 3 jene mit Hämoglobin, Reihe 5 und 6 jene mit Hämin

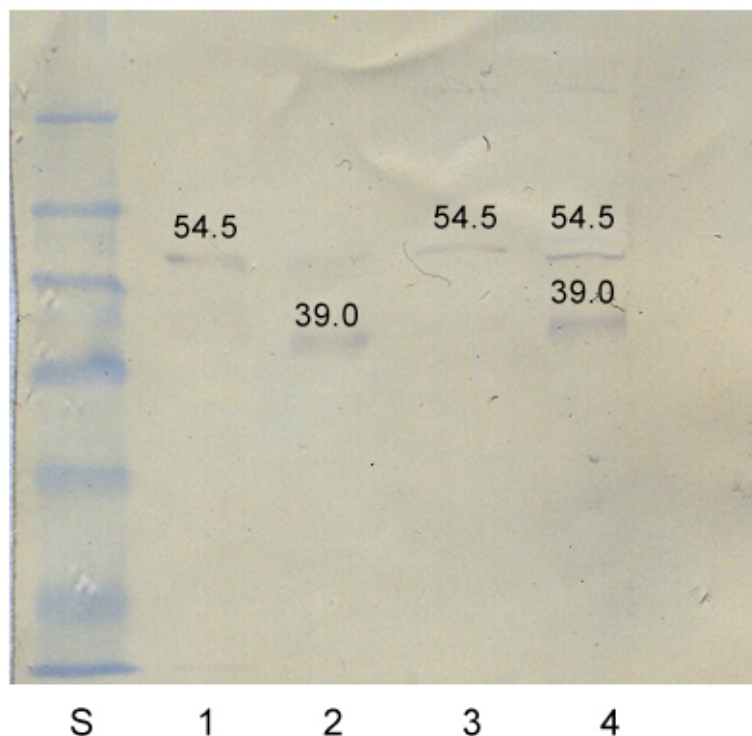


Abbildung 6a: Ligandenblot mit Transferrin. Banden: S=Standard; 1=Negative Kontrollpräparation; 2,3,4= *M.suis* Antigenpräparationen; Größenangaben der Banden in kDa

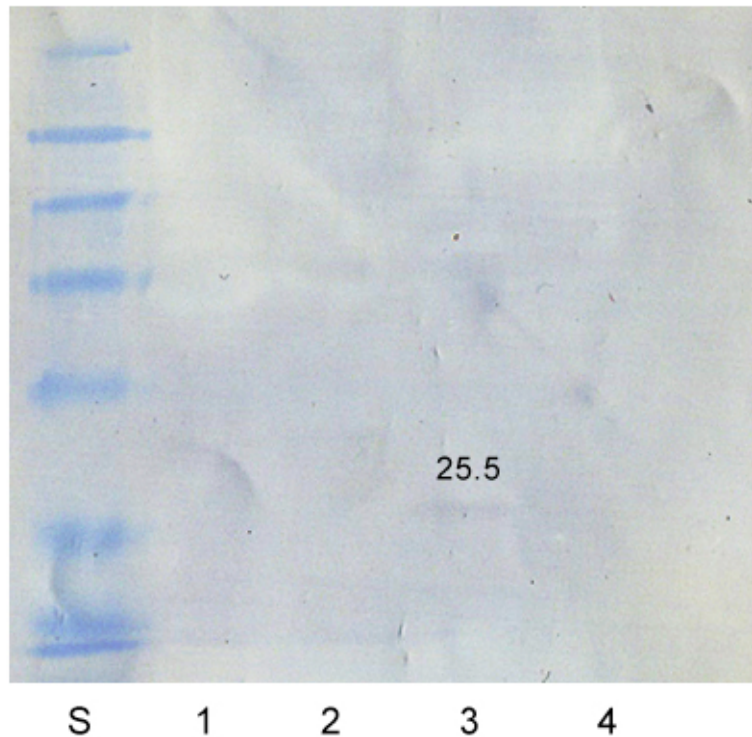


Abbildung 6b: Ligandenblot mit Hämoglobin. Banden: **S**=Standard; **1**=Negative Kontrollpräparation; **2,3,4**= *M.suis* Antigenpräparationen; Größenangabe der Bande in kDa

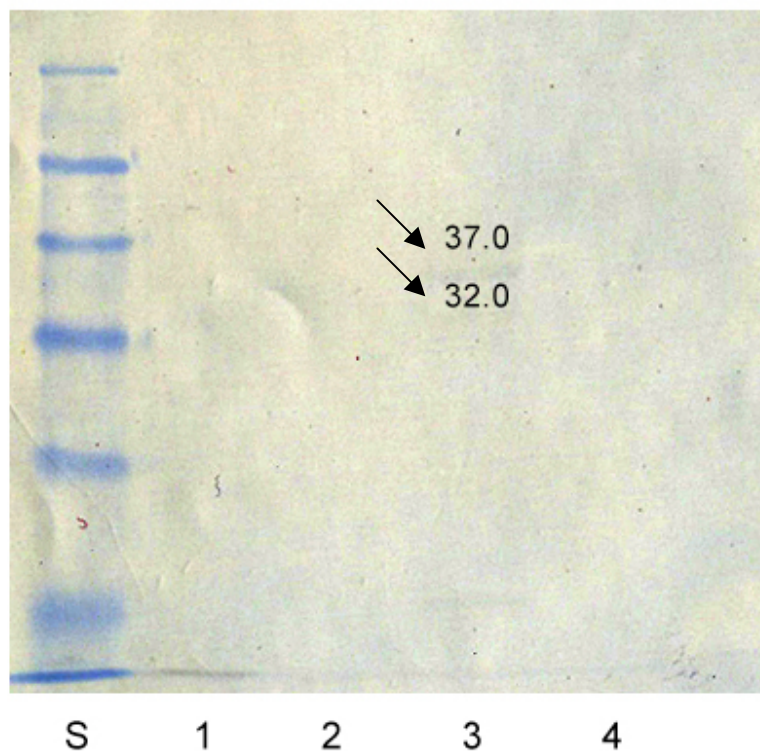


Abbildung 6c: Ligandenblot mit Hämin. Banden: **S**=Standard; **1**=Negative Kontrollpräparation; **2,3,4**= *M.suis* Antigenpräparationen; Größenangaben der Banden in kDa

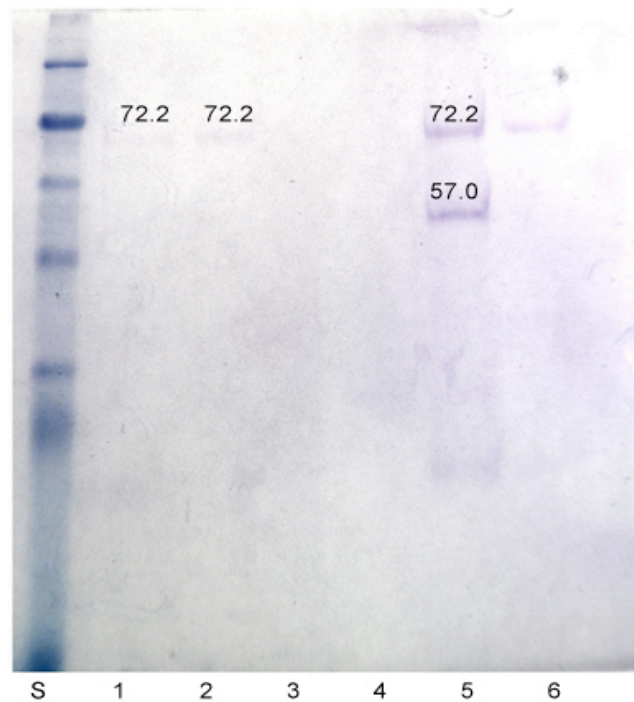


Abbildung 7a: Commassie gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel mit gefällten Eluaten von Transferrin gekoppelter Sepharose Säule. Banden: **S**=Standard; **1,2,3,4,5,6**=*M.suis* Antigenpräparation. Die Elution erfolgte durch Puffer mit verschiedenen pH Werten, Bande(B)1:pH6.5/ B2:pH6/ B3:pH5/ B4:pH4/ B5:pH3/ B6:pH2. Grössenangaben der Banden in kDa

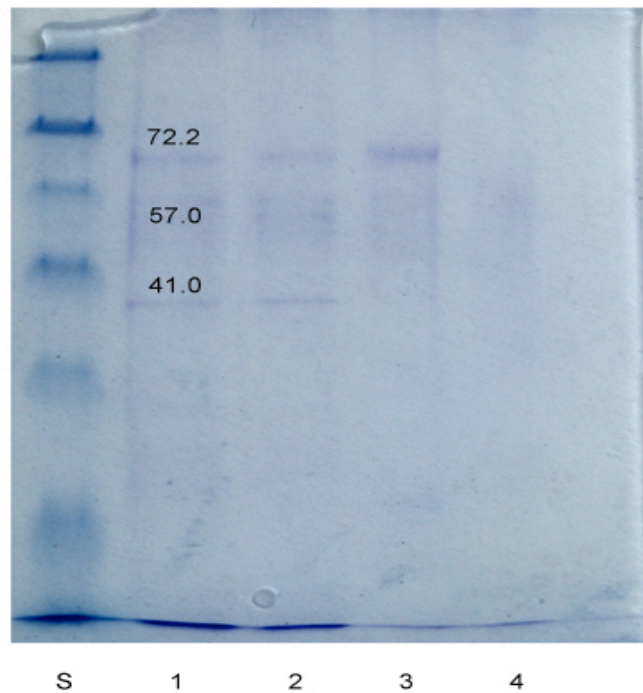


Abbildung 7b: Commassie gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel mit gefällten Eluaten von Hämoglobin gekoppelter Sepharose Säule. Banden: **S**=Standard; **1,2,3**=M.suis Antigenpräparationen; **4**=Negative Kontrollpräparation. Die Elution erfolgte durch einen Puffer mit pH2. Größenangaben der Banden in kDa

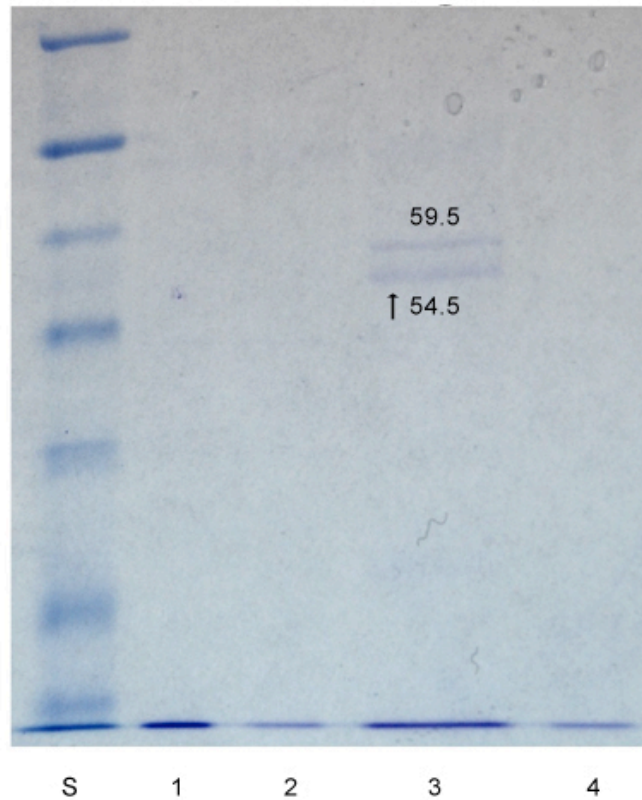


Abbildung 7c: Commassie gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel mit gefällten Eluaten von Hämin gekoppelter Sepharose Säule. Banden: **S**=Standard; **1,2,3**=M.suis Antigenpräparationen; **4**=Negative Kontrollpräparation. Die Elution erfolgte durch einen Puffer mit pH2. Grössenangaben der Banden in kDa

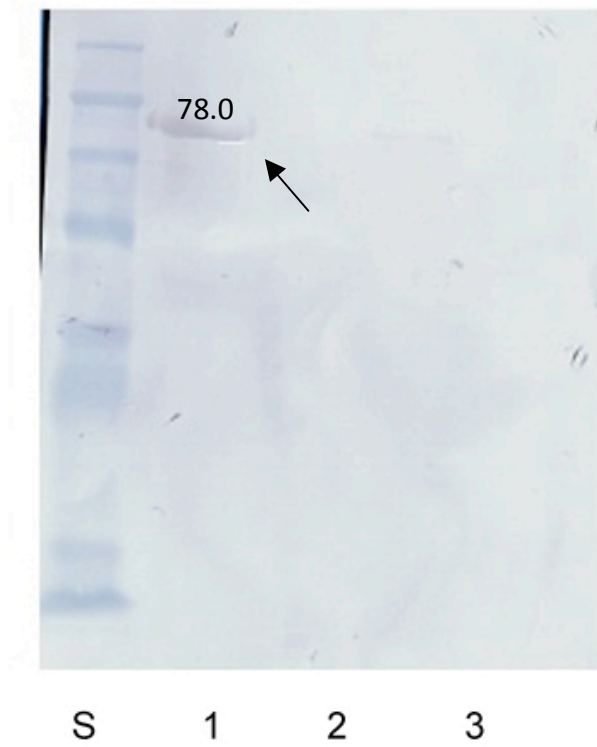


Abbildung 8 : Ligandenblot mit biotinyliertem MSG1. Banden: **S**=Standard, **1**=porcines Transferrin; **2**=kaninchen Transferrin; **3**=humanes Transferrin. Grössenangabe der Bande in kDa

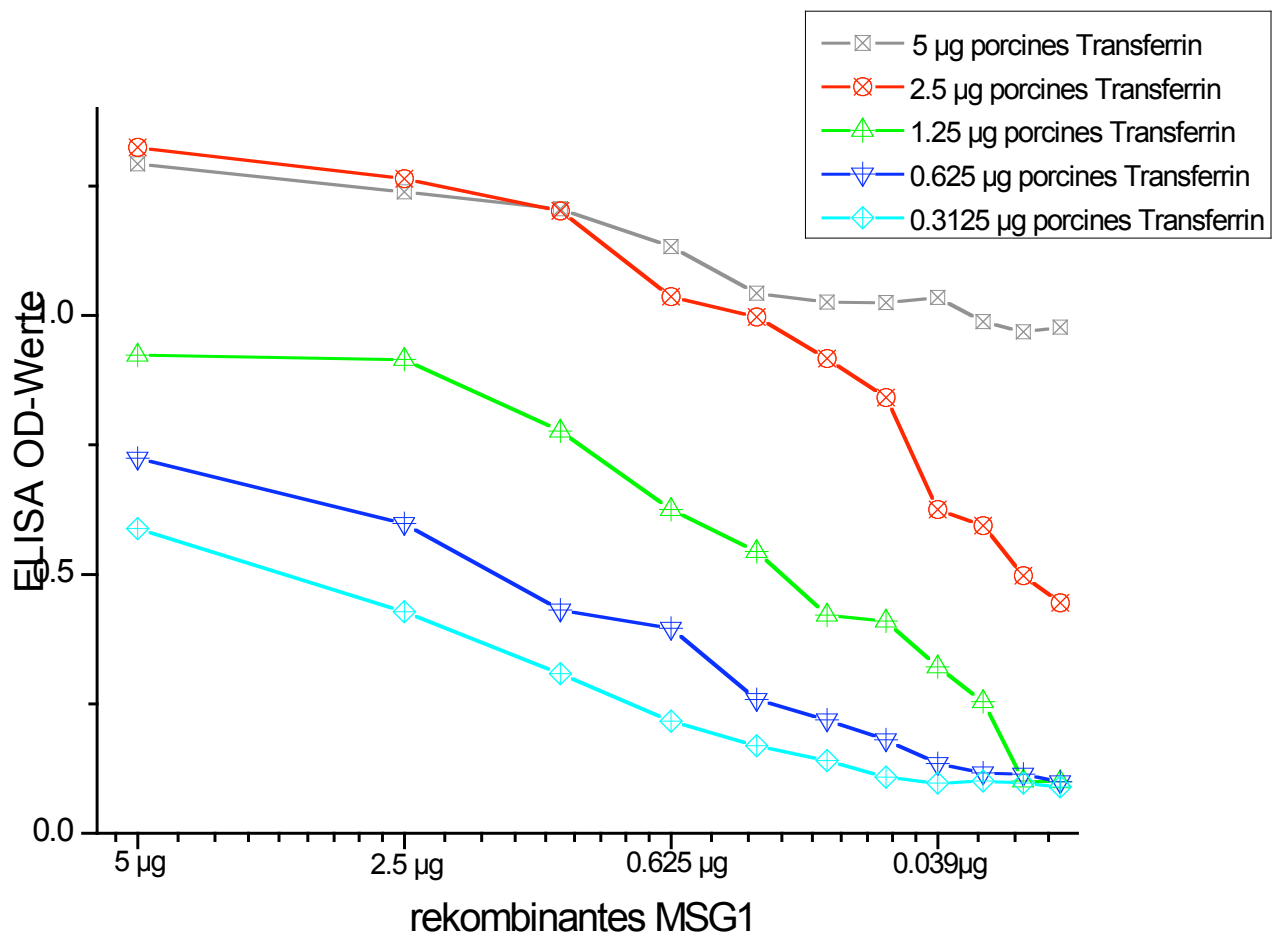


Abbildung 9: ELISA-Versuche. Konzentration abhängige Reaktion von *M. suis* MSG1 mit porcinem Transferrin. Bindung von *M. suis* MSG1 zudem abhängig von der Transferrin-Konzentration.

4. Diskussion

Die aktuelle *M. suis* Forschung legt den Schwerpunkt auf die Aufklärung der verschiedenen Interaktionen zwischen dem Wirt Schwein und dem Bakterium. Kenntnisse über diese Interaktionen sind wichtig, um in Zukunft effektive Massnahmen zur Behandlung und Prophylaxe von *M. suis*-Infektionen entwickeln zu können. Da der Erreger unkultivierbar ist und die Genomsequenzen noch nicht vollständig aufgeklärt sind, weiss man noch sehr wenig über molekulare Mechanismen dieser „host-pathogen-interaction“ (Hoelzle, 2008)

Die Fähigkeit, im Wirtsorganismus an essentielle Nährstoffe und damit auch an verfügbares Eisen zu gelangen, ist eine Grundvoraussetzung für Bakterien, um Wirte infizieren und kolonisieren zu können. Sie steht auch in enger Verbindung mit bakterieller Virulenz. Viele bakterielle Pathogene besitzen Mechanismen und Systeme um lebenswichtiges Eisen aus Transferrin, Hämin oder Hämoglobin zu akquirieren. So bindet z.B. *Bartonella quintana* ein ebenfalls haemotrophes Bakterium, Hämin in grossen Mengen (Carroll et al., 2000), *Actinobacillus pleuropneumoniae* dagegen besitzt hochaffine Rezeptoren für porcines Transferrin (Baltes et al., 2002). Zudem weiss man, dass Mutanten von *Actinobacillus pleuropneumoniae* und *Neisseria gonorrhoeae*, die nicht in der Lage sind Transferrin zu binden, avirulent sind (Baltes et al., 2002; Cornelissen et al., 1998). Solche Mutanten stellen wichtige Kandidaten für eine Impfstoff-Entwicklung dar. Somit könnte die Identifizierung von Transferrin-, Hämin-, oder Hämoglobin-bindenden Proteinen von *M. suis* einen wichtigen Schritt hin zur Entwicklung einer *M. suis*-Vakzine sein.

Zum jetzigen Zeitpunkt liegen für *M. suis* keine Hinweise vor, welches Fe-speichernde Wirtsprotein vom Bakterium benutzt wird, um seine Eisen-Bedürfnisse zu befriedigen oder auf welche Weise Eisen von *M. suis* aufgenommen wird. Bisher wurden keine Untersuchungen zu diesem Thema durchgeführt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden potentielle *M. suis*-Bindungspartner für die drei im Blut vorkommenden Fe-speichernden Proteine i.e., Hämoglobin, Hämin und Transferrin gesucht. Die drei Fe-haltigen Wirtsproteine Hämoglobin, Transferrin und Hämin wurden ausgewählt, da sie aufgrund der Lokalisation von *M. suis* im Schweineblut als potentielle Fe-Lieferanten in Frage kommen. Hämoglobin befindet sich zum überwiegenden Teil in den Erythrozyten, den Wirtszellen von *M. suis*, mit denen das Bakterium im engen Kontakt steht (Zachary & Basgall, 1985). Elektronenmikroskopisch findet man *M. suis* in tiefen Einbuchtungen auf der

Erythrozytenoberfläche und ein ca. 15-30 nm breiter Spalt, der die Bakterien von den roten Blutkörperchen trennt, ist sichtbar. Feine fibrilläre Strukturen binden *M. suis* an die Erythrozytenmembran (Messick, 2004; Zachary & Basgall, 1985). Es ist davon auszugehen, dass *M. suis* über diesen Kontakt essentielle Nährstoffe bezieht (Hoelzle, 2008). Ausserdem ist inzwischen bekannt, dass gewisse *M. suis*-Isolate die Fähigkeit zur Invasion in die Erythrozyten besitzen (Groebel et al., 2009). Hämin wurde ausgewählt, da bei Bartonellen, einer ebenfalls haemotrophen Bakterienspezies, Hämin-bindende Proteine vorkommen und Hämin für das *in vitro* Wachstum dieser Bakterien essentiell ist. Bislang wurden z.B. für *B. henselae* mindestens fünf Membran-assoziierte Proteine gefunden, die Hämin binden (Zimmermann et al., 2003). Transferrin stellt das wichtigste Fe-speichernde Protein im Serum dar. Es bindet freies Fe(III) im Serum (Guerinot, 1994). Daher muss Transferrin ebenfalls als ein potentieller Fe-Lieferant für haemotrophe Bakterien angesehen werden.

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene methodische Ansätze verwendet, um potentielle Fe-bindende *M. suis*-Proteine zu identifizieren. Bei dem ersten Ansatz wurden *M. suis*-Präparationen auf Nitrozellulose-Membranen immobilisiert und potentielle Bindungspartner mittels Bindung von Biotin-markiertem Transferrin, Hämoglobin bzw. Hämin gesucht. Beim zweiten Ansatz wurden Transferrin, Hämoglobin bzw. Hämin an Sepharose immobilisiert. Anschliessend wurden durch die Bindung von *M. suis* potentielle Bindungspartner gesucht. Beide Ansätze führten jedoch nicht zur Identifizierung von *M. suis*-Proteinen. Vielmehr wurden potentielle Bindungspartner bei den anschliessenden massenspektrometrischen Analysen immer eindeutig als porcine Proteine identifiziert. Genauer gesagt als porcine, im Blut vorkommende Proteine, wie Immunglobuline, Fibrinogen und Aktin, bei denen es sich wahrscheinlich um Verunreinigungen der *M. suis*-Präparationen handelt.

Bei beiden Ansätzen stand als Ausgangsmaterial *M. suis*-Zellen zur Verfügung, die aus dem Blut experimentell infizierter Tiere aufgereinigt wurden. Trotz mehrerer nacheinander durchgeführter differenzierender Zentrifugationsschritte (Hall et al., 1988; Hoelzle et al., 2006) enthalten so aufgereinigte *M. suis*-Präparationen nach wie vor einen relativ grossen Anteil an Schweineproteinen. Dieser Anteil an Wirtsproteinen wurde ersichtlich bei Western Blot Studien (Hoelzle et al., 2006) und bei Proteom-Immunom-Analysen von *M. suis* (Hoelzle et al., 2007a). Anscheinend reicht die Reinheit des zur Verfügung stehenden Materials nicht aus, um mit den angewendeten Methoden interagierenden Proteine zu identifizieren.

Die verwendeten Methoden sind womöglich auch fehlgeschlagen, weil ihre Sensitivität zu gering ist, um bei den in den Präparationen vorhandenen *M. suis* Quantitäten bindende *M. suis*-Proteine zu identifizieren. Aufgrund der Ergebnisse der von unserer Arbeitsgruppe durchgeführten Sequenzierung des Gesamtgenoms von *M. suis* und der anschliessenden Annotierung ist aber anzunehmen, dass *M. suis* Fe-bindende Proteine besitzt (Oehlerking et al., 2011). Offensichtlich besitzt *M. suis* eine Reihe von Transportern, die den Transport von Fe in die Zelle vermitteln. Vorläufig identifiziert wurden ein Gencluster, das für einen Fe-Phosphat-Transporter codiert, sowie Permeasen für Hämin und Ferrichrom. Damit diese Transporter Fe in die Zelle transportieren können, muss Eisen vorher aus Fe-bindenden Proteinen des Wirts akquiriert werden.

Im zweiten Teil der Arbeit untersuchten wir, ob das GAPDH-homologe Protein MSG1 von *M. suis* hinsichtlich der Fähigkeit der Transferrin-Bindung eine Rolle spielt. Von anderen GAPDH weiss man, dass sie in der Lage sind, an Transferrin/Laktotferrin zu binden. So bindet GAPDH von *Typanosoma brucei* an bovines und humanes Laktotferrin und bovines Transferrin (Tanaka et al., 2004). Für *Staphylococcus aureus* konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei einem Transferrin-bindendes Protein um eine zellwandständige GAPDH handelt (Modun & Williams, 1999). In der vorliegenden Arbeit konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass auch MSG1 von *M. suis* Transferrin-bindende Eigenschaften besitzt. Unsere Versuche ergaben, dass diese Bindung stark von der Konzentration abhängig ist. Interessanterweise war die MSG1-Bindung an humanes und Kaninchen-Transferrin signifikant schwächer. *M. suis* und auch andere haemotrophe Mykoplasmen weisen in der Regel eine strenge Wirtsspezifität auf (Hoelzle, 2008). Eine spezies-spezifische Bindung an Transferrin könnte ein Grund dafür sein.

Aufgrund des fehlenden Kultursystems konnten die Bindungsversuche ausschliesslich mit rekombinantem, in *Escherichia coli* hergestelltem Protein durchgeführt werden. Weitere Versuche mit MSG1 aus kultivierten *M. suis* sind notwendig, um diese Spezies-Spezifität genauer zu charakterisieren. Von anderen Mykoplasmen weiss man, dass aufgrund der relativ kleinen Genomgrössen dieser Bakterien viele Proteine als multifunktionelle Proteine fungieren (Yus et al., 2009; Baseman & Tully, 1997). Bei *M. suis* ist das Vorhandensein von multifunktionellen Proteinen bisher nur für MSG1 nachgewiesen. In seiner Funktion als GAPDH ist MSG1 im Cytoplasma ein Schlüsselenzym im Kohlenhydratstoffwechsel und ebenso als Oberflächen-lokalisiertes *M. suis*-Protein an der Adhärenz von *M. suis* an die

Erythrozyten-Oberfläche beteiligt (Hoelzle et al., 2007). Die, in dieser Arbeit identifizierten Fähigkeit, an Transferrin zu binden, stellt anscheinend eine weitere Funktion von MSG1 dar. Das Genom von *M. suis* ist mit einer Grösse von ca. 709 kbp (Oehlerking et al., 2011) im unteren Grössenbereich des Genus *Mycoplasma* (kleinstes Genom *M. genitalium* mit ca. 580 kbp, grösstes Genom *M. penetrans*. 1,36 Mbp; Fraser et al., 1995; Sasaki et al., 2002).

Zusammenfassend kann man sagen: Die Sensitivität und/oder Spezifität der verwendeten Methoden reicht anscheinend nicht aus, um aus den *M. suis* Präparationen, die uns zur Verfügung standen, Transferrin-, Hämoglobin-, oder Hämin-bindende *M. suis*-Proteine zu identifizieren. Um dies in Zukunft zu ermöglichen, braucht es entweder *M. suis*-Präparationen mit weniger Wirt-Kontamination oder *M. suis*, die aus einem zellfreien in vitro-Kultursystem zur Verfügung stehen. Im Rahmen dieser Arbeit konnten wir indessen nachweisen, dass das glykolytisch aktive Adhäsionsprotein MSG1, Spezies-spezifische, Transferrin-bindende Eigenschaften besitzt. Weitere Arbeiten sind notwendig, um den genauen molekularen Mechanismus dieser Interaktion aufzuklären.

5 Referenzen

- Aisen P, Listowsky I. 1980. Iron transport and storage proteins. *Annu Rev Biochem.*; 49:357–393.
- Barker E. N, Helps C. R, Neimark H, Peters I. R, Peters W, Tasker S. 2011. A novel haemoplasma species identified in archived primate blood smears. *Vet Microbiol.* May 5;149(3-4):478-81.
- Barker E. N, Darby A. C, Helps C. R, Peters I. R, Heesom K. J, Arthur C. J, Crossett B, Hughes M. A, Radford A. D, Tasker S. 2011. Molecular characterization of the uncultivable hemotropic bacterium *Mycoplasma haemofelis*. *Vet Res.* Jul 12;42(1):83.
- Bauminger E. R, Cohen S. G, Labenski de Kanter F, Levy A, Ofer S, Kessel M, Rottem S. 1980. Iron storage in *Mycoplasma capricolum*. *J Bacteriol.* Jan;141(1):378–381.
- Bezkorovainy A. 1981. Antimicrobial properties of iron-binding proteins. *Adv Exp Med Biol.*;135:139–154.
- Bodilis J, Cornelis P. 2009. A survey of TonB-dependent receptors in fluorescent pseudomonads. *Environ Microbiol Rep* 1:256–262
- Braun V, Hantke K, Koster W. 1998. Bacterial iron transport: mechanisms, genetics, and regulation. *Met Ions Biol Syst.* 35:67–145.
- Brownback A. 1981. Eperythrozoonosis as a cause of infertility in swine. *Vet. Med. Small Anim. Clin.* 76:375-378.
- Carroll J. A, Coleman S. A, Smitherman L. S, Minnick M. F. 2000. Hemin-binding surface protein from *Bartonella quintana*. *Infect Immun.*;68:6750–6757.
- Deneer H. G, and Potter A. A. 1989. Effect of iron restriction on the outer membrane proteins of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae*. *Infect. Immun.* 57:798-804.
- Dieckmann S. M, Winkler M, Groebel K, Dieckmann M. P, Hofmann-Lehmann R, Hoelzle K, Wittenbrink M. M, Hoelzle L. E. 2010. Haemotrophic *Mycoplasma* infection in horses. *Vet Microbiol.*
- Dorsey C. W, Tomaras A. P, Connerly P. L, Tolmasky M. E, Crosa J. H, Actis L. A. 2004. The siderophore-mediated iron acquisition systems of *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 and *Vibrio anguillarum* 775 are structurally and functionally related. *Microbiology* 150:3657–3667. doi:10.1099/mic.0.27371-0
- dos Santos A. P, dos Santos R. P, Biondo A. W, Dora J. M, Goldani L. Z, de Oliveira S, de Sa Guimaraes A. M, Timenetsky J, de Moraes H. A, Gonzalez F. H, and Messick J. B. 2008. Hemoplasma infection in HIV-positive patient, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* 14:1922-1924.

Dyer D. W, West E. P, and Sparling P. F. 1987. Effects of serum carrier proteins on the growth of pathogenic *Neisseriae* with heme-bound iron. *Infect Immun* 55: 2171–2175

Earhart C. F. 1996. Uptake and metabolism of iron and molybdenum. In: Neidhardt, F.C. (ed.): *Escherichia coli* and *Salmonella*. Cellular and molecular biology, 2nd edition ASM Press, Washington D.C., U.S.A., 1075-1090

Emery T. 1991. Iron and your health. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.

Felder K. M, Hoelzle K, Heinritzi K, Ritzmann M, Hoelzle L. E. 2010. Antibodies to actin in autoimmune haemolytic anaemia. *BMC Vet Res*. 30;6:18.

Felder K. M, Hoelzle K, Ritzmann M, Kilchling T, Schiele D, Heinritzi K, Groebel K, Hoelzle L. E. 2011. Hemotrophic mycoplasmas induce programmed cell death in red blood cells. *Cell Physiol Biochem*.27(5):557-64.

Foley J. E, and Pedersen N. C. 2001. „'Candidatus *Mycoplasma haemominutum*', a low-virulence epierthrocytic parasite of cats.“ *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*.51:815-817.

Gray-Owen S. D, and Schryvers A. B. 1996. Bacterial transferrin and lactoferrin receptors. *Trends Microbiol* 4: 185–191.

Gerlach G. F, Klashinsky S, Anderson C, Potter A. A, and Willson P. J. 1992. Characterization of two genes encoding distinct transferrin-binding proteins in different *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolates. *Infect. Immun*. 60, 3253-3261

Gonzalez G. C, Caamano D. L, and Schryvers A. B. 1990. VOL. 60, 1992 Identification and characterization of a porcine-specific transferrin receptor in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Mol. Microbiol*. 4:1173-1179.

Greenwald J, Zeder-Lutz G, Hagege A, Celia H, Pattus F. 2008. The metal dependence of pyoverdine interactions with its outer membrane receptor FpvA. *J Bacteriol* 190:6548–6558

Griffiths E. 1991. Iron and bacterial virulence--a brief overview. *Biol. Met*. 4, 7-13

Groebel K, Hoelzle K, Wittenbrink M. M, Ziegler U, and Hoelzle L. E. 2009. Unraveling a paradigm: *Mycoplasma suis* invades porcine erythrocytes, *Infect Immun* 77 pp. 576–584.

Guerinot M. L. 1994. Microbial iron transport. *Annu. Rev. Microbiol*. 48, 743-77 Haag H, Fiedler H. P, Meiwes J, Drechsel H, Jung G, and Zahner H. 1994. Isolation and biological characterization of staphyloferrin B, a compound with siderophore activity from staphylococci. *FEMS Microbiol. Lett*. 115:125-130.

Guimaraes A. M, Biondo A. W, Lara A. C, Messick J. B. 2007. Exploratory study of *Mycoplasma suis* (*Eperythrozoon suis*) on four commercial pig farms in southern Brazil. *Vet Rec*. Jan 13;160(2):50-3.

Guimaraes A. M, Santos A. P, SanMiguel P, Walter T, Timenetsky J, Messick J. B. 2011. Complete genome sequence of *Mycoplasma suis* and insights into its biology and adaption to an erythrocyte niche. PLoS One. May 10;6(5):e19574.

Harrison P. M, and Lilley T. H. 1989. Iron Carriers and Iron Proteins (Loehr, T. M., ed) pp. 123–238, VCH Publishers, Inc., New York.

Henderson J. P, O'Hagan J, Hawe S. M, Pratt M .C. 1997. Anaemia and low viability in piglets infected with *Eperythrozoon suis*. Vet Rec;140:144–6.

Heinritzi K, Wentz I, Bollwahn W. 1984. Hematologic findings in acute eperythrozoonosis of swine. Berl Munch Tierarztl Wochenschr.;97(11):404-7.

Heinritzi K. 1989. Eperythrozoon infection in swine as a disease factor. Berl Munch Tierarztl Wochenschr.1;102(10):337-42.

a)Heinritzi K, Plank G, Peteranderl W, Sandner N. 1990. The acid-base equilibrium and carbohydrate metabolism during infection with *Eperythrozoon suis*. Zentralbl Veterinarmed B.;37(6):412-7.

b)Heinritzi K, Peteranderl W, Plank G. 1990. Eperythrozoon infection in swine: effect on the acid-base balance and the glucose, lactate and pyruvate content of venous blood. Dtsch Tierarztl Wochenschr.;97(1):31-4.

Henry S. C. 1979. Clinical observations on eperythrozoonosis. J. Am. Vet. Med. Assoc. 174:601-603.

Hoelzle L. E, Hoelzle K, Ritzmann M, Heinritzi K, and Wittenbrink M. M. 2006. *Mycoplasma suis* antigens recognized during humoral immune response in experimentally infected pigs. Clin. Vaccine Immunol. 13:116-122.

Hoelzle L. E. 2007. Significance of haemotrophic mycoplasmas in veterinary medicine with particular regard to the *Mycoplasma suis* infection in swine. Berl. Muench. Tieraerztl. Wochenschr. 12034-41.

Hoelzle L. E, Hoelzle K, Helbling M, Aupperle H, Schoon H. A, Ritzmann M, Heinritzi K, Felder K. M, and Wittenbrink M. M. 2007. MSG1, a surface-localised protein of *Mycoplasma suis* is involved in the adhesion to erythrocytes. Microbes Infect. 9:466-474.

Hoelzle K, Doser S, Ritzmann M, Heinritzi K, Palzer A, Elicker S, Kramer M, Felder K. M, Hoelzle L. E. 2009. Vaccination with the *Mycoplasma suis* recombinant adhesion protein MSG1 elicits a strong immune response but fails to induce protection in pigs. Vaccine. 27;27(39):5376-82. Epub 2009 Jul 9.

Hoelzle K, Engels M, Kramer M, Wittenbrink M. M, Dieckmann S. M, Hoelzle L. E. 2010. Occurrence of *Mycoplasma suis* in wild boars (*Sus scrofa* L.). Vet Microbiol. 143(2-4):405-9.

- Hornok S, Meli M. L, Erdos A, Hajtos I, Lutz H, and Hofmann-Lehmann R. 2009. "Molecular characterization of two different strains of haemotropic mycoplasmas from a sheep flock with fatal haemolytic anaemia and concomitant *Anaplasma ovis* infection." *Vet. Microbiol.* 136:372-377.
- Hu Z, Yin J, Shen K, Kang W, Chen Q. 2009. Outbreaks of hemotropic mycoplasma infections in China. *Emerg Infect Dis.*;15(7):1139-40.
- Imperi F, Tiburzi F, Visca P. 2009. Molecular basis of pyoverdine siderophore recycling in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:20440–20445
- Kanter F, Levy A, Ofer S, Kessel M, Rottem S. 1980. Iron storage in *Mycoplasma capricolum*. *J Bacteriol*; 141(1):378–381.
- Konetschny-Rapp S, Jung G, Meiwes J, and Zahner H. 1990. Staphyloferrin A: a structurally new siderophore from staphylococci. *Eur. J. Biochem.* 191:65-74.
- Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.*;227(5259):680–685.
- Lang F, Lang K. S, Lang P. A, Huber S. M, Wieder T. 2006. Mechanisms and significance of eryptosis. *Antioxid Redox Signal.* 2006 Jul-Aug;8(7-8):1183-92.
- Liebich H. G, Heinritzi K. 1992. Light and electron microscopic studies of *Eperythrozoon suis*. *Tierarztl Prax.* 20(3):270-4.
- Litwin C. M. and Calderwood S. B. 1993. Role of iron in regulation of virulence genes. *Clin. Microbiol. Rev.* 6, 137-149
- Martinez J. L, Delgado-Iribarren A, and Baquero F. 1990. Mechanisms of iron acquisition and bacterial virulence. *FEMS Microbiol. Rev.* 6, 45-56
- Massover W. H. 1993. Ultrastructure of ferritin and apoferritin: a review. *Micron* 24: 389-437.
- May J. J, Wendrich T. M, Marahiel M. A. 2001. The *dhb* operon of *Bacillus subtilis* encodes the biosynthetic template for the catecholic siderophore 2,3-dihydroxybenzoate-glycine-threonine trimeric ester bacillibactin. *J Biol Chem.*;276:7209–7217.
- McLaughlin B. G, McLaughlin P. S, Evans C. N. 1991. An *Eperythrozoon*-like parasite of llamas: attempted transmission to swine, sheep, and cats. *J Vet Diagn Invest.* 3(4):352-3.
- Messick J. B. 2004. Hemotropic mycoplasmas (hemoplasmas): a review and new insights into pathogenic potential. *Vet. Clin. Pathol.* 332-13
- Messick J. B, Smith G, Berent L, and Cooper S. 2000. Genome size of *Eperythrozoon suis* and hybridization with 16S rRNA gene. *Can. J. Microbiol.* 46:1082-1086

Messick J. B, Walker P. G, Raphael W, Berent L, and Shi X. 2002. „'Candidatus Mycoplasma haemodidelphidis' sp. nov., 'Candidatus Mycoplasma haemolamae' sp. nov. and Mycoplasma haemocanis comb. nov., haemotrophic parasites from a naturally infected opossum (*Didelphis virginiana*), alpaca (*Lama pacos*) and dog (*Canis familiaris*): phylogenetic and secondary structural relatedness of their 16S rRNA genes to other mycoplasmas.“ *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52:693-698.

Messick J. B. 2004. Hemotrophic mycoplasmas (hemoplasmas): a review and new insights into pathogenic potential. *Vet. Clin. Pathol.* 332-13

Messick J. B, Santos A. P, Guimaraes A. M. 2011. Complete Genome Sequences of Two Hemotropic Mycoplasmas, *Mycoplasma haemofelis* Strain Ohio2 and *Mycoplasma suis* Strain Illinois. *J Bacteriol. Apr*;193(8):2068-9.)

Mietzner T. A, and Morse S. A. 1994. The role of iron-binding proteins in the survival of pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Nutr.* 14, 471-493

Neimark H, Johansson K. E, Rikihisa Y, Tully J. G. 2001. Proposal to transfer some members of the genera *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* to the genus *Mycoplasma* with descriptions of 'Candidatus *Mycoplasma haemofelis*', 'Candidatus *Mycoplasma haemomuris*', 'Candidatus *Mycoplasma haemosuis*' and 'Candidatus *Mycoplasma wenyonii*' *Int J Syst Evol Microbiol.*;51(Pt 3):891–899.

Neimark H, Barnaud A, Gounon P, Michel J. C, and Contamin H. 2002. „The putative haemobartonella that influences *Plasmodium falciparum* parasitaemia in squirrel monkeys is a haemotrophic mycoplasma.“ *Microbes Infect.* 4:693-698.

Neimark H. 2004. „*Mycoplasma ovis* comb. nov. (formerly *Eperythrozoon ovis*), an eperythrocytic agent of haemolytic anaemia in sheep and goats.“ *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54:365-371.

Neimark H, Peters C. W, Robinson B. L, and Stewart L. 2005. „Phylogenetic analysis and description of *Eperythrozoon coccoides*, proposal to transfer to the genus *Mycoplasma* as *Mycoplasma coccoides* comb. nov. and Request for an Opinion.“ *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55:1385-1391.

Nijssen E, Cescau S, Vayssier-Taussat M, Wang J, Biville F. 2009. Identification of mechanisms involved in iron and haem uptake in *Bartonella birtlesii*: in silico and in vivo approaches. *Clin Microbiol Infect.*;15 Suppl 2:118-9.

Nonaka N, Thacker B. J, Schillhorn van Veen T. W, Bull R. W. 1996. In vitro maintenance of *Eperythrozoon suis*. *Vet. Parasitol.*;61:181–199.

Ochsner U. A, Wilderman P. J, Vasil A. I, Vasil M. L. 2002. GeneChip expression analysis of the iron starvation response in *Pseudomonas aeruginosa*: identification of novel pyoverdine biosynthesis genes. *Mol Microbiol* 45:1277–1287

- Oehlerking J, Kube M, Felder K. M, Matter D, Wittenbrink M. M, Schwarzenbach S, Kramer M. M, Hoelzle K, Hoelzle L. E. 2011. The complete genome sequence of the hemotrophic *Mycoplasma suis*_KI3806. *J Bacteriol*
- Ollinger J, Song K. B, Antelmann H, Hecker M, Helmann J. D. 2006. Role of the Fur regulon in iron transport in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.*;188:3664–3673.
- Otto B. R, Verweij-van Vught A. M, MacLaren D. M. 1992. Transferrins and Heme-Compounds as Iron Sources for Pathogenic Bacteria. *Crit Rev Microbiol* 18: 217-233.
- Pancholi V, and Chhatwal G. S. 2003. Housekeeping enzymes as virulence factors for pathogens. *Int. J. Med. Microbiol.* 293:391-401.
- Parrow N. L, Abbott J, Lockwood A. R, Battisti J. M, Minnick M. F. 2009. Function, regulation, and transcriptional organization of the hemin utilization locus of *Bartonella quintana*. *Infect Immun.*;77:307–316.
- Perry R. D. 1993. Acquisition and storage of inorganic iron and hemin by the yersiniae. *Trends Microbiol.* 1:142-47.
- Posey J. E, Gherardini F. C. 2000. Lack of a role for iron in the Lyme disease pathogen. *Science.*;288:1651–1653.
- Prullage J. B., Williams R. E, and Gaafar S. M. 1993. On the transmissibility of Eperythrozoon suis by Stomoxys calcitrans and Aedes aegypti. *Vet. Parasitol.* 50:125-135.
- Ritzmann M, Grimm J, Heinritzi K, Hoelzle K, Hoelzle L. E. 2009. Prevalence of *Mycoplasma suis* in slaughter pigs, with correlation of PCR results to hematological findings. *Vet Microbiol.* 133(1-2):84-91.
- Sander A, Kretzer S, Bredt W, Oberle K, and Bereswill S. 2000. Hemin-dependent growth and hemin binding of *Bartonella henselae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 189:55-59.
- Santos A. P, Guimaraes A. M, do Nascimento N. C, Sanmiguel P. J, Martin S. W, Messick J. B. 2011. Genome of *Mycoplasma haemofelis*, unraveling its strategies for survival and persistence. *Vet Res. Sep* 21;42(1):102.
- Schalk I. J, Abdallah M. A, Pattus F. 2002. Recycling of pyoverdine on the FpvA receptor after ferric pyoverdine uptake and dissociation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry* 41:1663–1671
- Schneider R, Hantke K. 1993. Iron-hydroxamate uptake systems in *Bacillus subtilis*: Identification of a lipoprotein as a part of a binding protein-dependent transport system. *Mol Microbiol.*;8:111–121.
- Schreiner S. A, Sokoli A, Felder K. M, Wittenbrink M. M, Schwarzenbach S, Guhl B, Hoelzle K, Hoelzle L. E. 2012. The surface-localised α -enolase of *Mycoplasma suis* is an adhesion protein. *Vet Microbiol. Apr* 23;156(1-2):88-95.

Schryvers A. B. and Gonzalez G. C. 1990. Receptors for transferrin in pathogenic bacteria are specific for the host's protein. *Can. J. Microbiol.* 36, 145-147.

Schweighardt H, Fellner A, Pechan P, Lauermann E. 1986. Eperythrozoonose beim Schwein- ein Fallbericht. *Wien.Tierärztl Mschr*; 73:250-253.

Seubert A, Schulein R, Dehio C. 2002. Bacterial persistence within erythrocytes: a unique pathogenic strategy of *Bartonella* spp. *Int J Med Microbiol* 291:555-60.

Skaar E. P, Humayun M, Bae T, DeBord K. L, and Schneewind O. 2004. *Science* 305, pp. 1626–1628.

Smith J. E, Cipriano J. E, Hall S. M. 1990. In vitro and in vivo glucose consumption in swine eperythrozoonosis. *Zentralbl Veterinarmed B.*;37:587–592.

Steer J. A, Tasker S, Barker E. N, Jensen J, Mitchell J, Stocki T, Chalker V. J, Hamon M. 2011. A novel hemotropic *Mycoplasma* (hemoplasma) in a patient with hemolytic anemia and pyrexia. *Clin Infect Dis.*Dec;53(11):e147-51.

Stintzi A, Barnes C, Xu J, Raymond K. N. 2000. Microbial iron transport via a siderophore shuttle: a membrane ion transport paradigm. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 97(20):10691-6.

Stoebner J. A, Payne S. M. 1988. Ironregulated hemolysin production and utilization of heme and hemoglobin by *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.* 56:289 1 -95.

Sykes J. E, Ball L. M, Bailiff N. L, and Fry M. M. 2005., „Candidatus *Mycoplasma haematoparvum*’, a novel small haemotropic mycoplasma from a dog.“ *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55:27-30. Published online 28 June 2004: DOI 10.1099/ijs.0.02989-0

Sykes J. E, Lindsay L. L, Maggi R. G, Breitschwerdt E. B. 2010. Human coinfection with *Bartonella henselae* and two hemotropic mycoplasma variants resembling *Mycoplasma ovis*. *J Clin Microbiol.* Oct;48(10):3782-5.

Tagawa M, Matsumoto K, and Inokuma H. 2008. „Molecular detection of *Mycoplasma wenyonii* and ‚Candidatus *Mycoplasma haemobos*’ in cattle in Hokkaido, Japan.“ *Vet. Microbiol.* 132:177-80.

Tryon V. V, and Baseman J. B. 1987. The acquisition of human lactoferrin by *Mycoplasma pneumoniae*. *Microb. Pathog.* 3:437-443.

Vieira R.F, Molento M. B, dos Santos L. C, Moraes W, Cubas Z. S, Santos A. P, Guimaraes A. M, Mohamed A, Barros Filho I. R, Biondo A. W, Messick J. B. 2009. Detection of a novel hemoplasma based on 16S rRNA gene DNA in captive and free-ranging capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*). *Vet Microbiol.* 2009 Nov 18;139(3-4):410-3. Epub 2009 Jun 21.

Volokhov D. V, Norris T, Rios C, Davidson M. K, Messick J. B, Gulland F. M, Chizhikov V. E. 2011. Novel hemotrophic mycoplasma identified in naturally infected California sea lions (*Zalophus californianus*). *Vet Microbiol.* Apr 21;149(1-2):262-8.

Watanabe Y, Fujihara M, Obara H, Matsubara K, Yamauchi K, Harasawa R. J. 2010. Novel hemoplasma species detected in free-ranging sika deer (*Cervus nippon*). *Vet Med Sci.* Nov;72(11):1527-30. Epub 2010 Jul 13.

Weinberg E. D. 1997. The Lactobacillus anomaly: total iron abstinence. *Perspect. Biol. Med.* 40:578-583.

Weinberg E. D. 2009. Iron availability and infection. *Biochim Biophys Acta.*;1790:600–605.

West S. E. H, and Sparling P. F. 1985. Response of *Neisseria gonorrhoeae* to iron limitation: alterations in expression of membrane proteins without apparent siderophore production. *Infect Immun* 47: 388–394.

Willi B, Boretti F. S, Cattori V, Tasker S, Meli M. L, Reusch C, Lutz H, Hofmann-Lehmann R. 2005. „Importance of the two known and the third novel feline hemoplasma species in Swiss cats.“ *J. Clin. Microbiol.* 43:2581-2585.

Willi B, Boretti F. S, Cattori V, Tasker S, Meli M. L, Reusch C. E, Lutz H, Hofmann-Lehmann R. 2005. Identification, molecular characterization, and experimental transmission of a new hemoplasma isolate from a cat with hemolytic anemia in Switzerland. *J. Clin. Microbiol.* 43:2581–2585

Wu J, Yu J, Song C, Sun S, Wang Z. 2006. Porcine eperythrozoonosis in China. *Ann N Y Acad Sci.* Oct;1081:280-5.

Yamamoto S, Okujo N, Sakakibara Y. 1994. Isolation and structure elucidation of acinetobactin, a novel siderophore from *Acinetobacter baumannii*. *Arch Microbiol* 162:249–252

Yuan C. L, Liang A. B, Yao C. B, Yang Z. B, Zhu J. G, Cui L, Yu F, Zhu N. Y, Yang X. W, Hua X. G. 2009. Prevalence of *Mycoplasma suis* (Eperythrozoon suis) infection in swine and swine-farm workers in Shanghai, China. *Am J Vet Res.* Jul;70(7):890-4.

Zachary J. F, and Basgall J. E. 1985. Erythrocyte membrane alterations associated with the attachment and replication of *Eperythrozoon suis*: a light and electron microscopic study. *Vet. Pathol.* 22:164-170.

Zachary J. F, Smith A. R. 1985. Experimental porcine eperythrozoonosis: T-lymphocyte suppression and misdirected immune responses. *Am. J. Vet. Res.*;46:821–830.

Zhou R. Q, Nie K, Huang H. C, Hu S. J, Zhou Z. Y, Luo H. L. 2009. Phylogenetic analysis of *Mycoplasma suis* isolates based on 16S rRNA gene sequence in China. *Vet Res Commun.*

Zinn G. M, Jesse G. W, and Dobson A. W. 1983. Effect of eperythrozoonosis on sow productivity. J. Am. Vet. Med. Assoc. 182:369-371

Danksagung

Ich möchte mich bei allen ganz herzlich bedanken, die zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen haben! Ganz besonders danke ich:

Herrn Prof. Dr. M.M. Wittenbrink , dass ich an seinem Institut als Doktorandin mitarbeiten durfte,

Frau Dr. Katharina Hoelzle für ihre fachliche Unterstützung, geduldige Betreuung, konstruktiven Vorschlägen und hohe Hilfsbereitschaft,

Herrn Prof. Dr. Ludwig Hoelzle für die Übernahme des Referats,

Frau Prof. Dr. Regina Hofmann-Lehmann für das Erstellen des Korreferats,

allen Mitarbeitern des Institut für Veterinärbakteriologie der Universität Zürich für die gute Zusammenarbeit und freundliche Unterstützung, ganz besonders Katrin Felder und Manuela Kramer,

Richard Diethelm für die sprachliche Überarbeitung der Dissertation,

meinen Eltern, Monika und Heinrich Schweizer, für die Finanzierung meines Studiums und moralische Unterstützung in Krisenzeiten ,

Stefan Diethelm für die geduldige Mithilfe bei den Grafiken und Bewältigung diverser Hochs und Tiefs während meiner gesamten Studienzeit!!

Curriculum Vitae

Name	Schweizer Nicole
Geburtsdatum	22.01.1983
Geburtsort	Zürich
Nationalität	CH
Heimatort	Zumikon, Zürich

1989-1995	Primarschule Zumikon
1995-1997	Sekundarschule Zumikon
1997-2002	Kantonsschule Küsnacht
2002	Mittelschulabschluss, Matura Typus D, Kantonsschule Küsnacht,

2005-2011	Studium der Veterinärmedizin an der Vetsuisse Fakultät, Universität Zürich
10/2011	Abschlussprüfung vet.med. Universität Zürich

2009-2012	Anfertigung der Dissertation unter Leitung von Prof . Dr. L. E. Hoelzle am Institut für Veterinärbakteriologie der Vetsuisse Fakultät Universität Zürich, Direktor Prof. Dr. M. M. Wittenbrink
-----------	--

05/2012	Assistenzärztin in der Tierarztpraxis Tau in Au, Wädenswil
---------	--